

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

ANNÉE 1946

THESE

N°

429

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Pierre, Henri, Robert CORVAZIER

Né le 19 Septembre 1918, à Angers (Maine-et-Loire).

Présentée et soutenue publiquement le 24 juin 1946

LES PROPRIETES ANTIBIOTIQUES
DE BACILLUS SUBTILIS ET SES
APPLICATIONS THERAPEUTIQUES

Président : M. LOEPER, Professeur.

PARIS
IMPRIMERIE R. FOULON
29, RUE DEPARCIEUX, 29
1946

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Nom du Candidat : **CORVAZIER.**

Prénoms : **Pierre, Henri, Robert.**

Date de soutenance : 24 Juin 1946.

Numéro d'ordre :

(Ces deux mentions seront complétées par le Service de la Bibliothèque).

CORVAZIER (Pierre, Henri, - Robert). — Les propriétés antibiotiques de bacillus subtilis et ses applications thérapeutiques. — Paris, Imp. R. Foulon, 1946, in-8°, 100 p., 2 fig.

(Thèse Médec. (Et.), Paris 1946, N°).

CORVAZIER (Pierre, Henri, - Robert). — Les propriétés antibiotiques de bacillus subtilis et ses applications thérapeutiques. — Paris, Imp. R. Foulon, 1946, in-8°, 100 p., 2 fig.

(Thèse Médec. (Et.), Paris 1946, N°).

CORVAZIER (Pierre, Henri, - Robert). — Les propriétés antibiotiques de bacillus subtilis et ses applications thérapeutiques. — Paris, Imp. R. Foulon, 1946, in-8°, 100 p., 2 fig.

(Thèse Médec. (Et.), Paris 1946, N°).

CORVAZIER (Pierre, Henri, - Robert). — Les propriétés antibiotiques de bacillus subtilis et ses applications thérapeutiques. — Paris, Imp. R. Foulon, 1946, in-8°, 100 p., 2 fig.

(Thèse Médec. (Et.), Paris 1946, N°).

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

ANNÉE 1946

THESE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Pierre, Henri, Robert CORVAZIER

Né le 19 Septembre 1918, à Angers (Maine-et-Loire).

Présentée et soutenue publiquement le 24 juin 1946

LES PROPRIETES ANTIBIOTIQUES
DE BACILLUS SUBTILIS ET SES
APPLICATIONS THERAPEUTIQUES

Président : M. LOEPER, Professeur.

PARIS
IMPRIMERIE R. FOULON
29, RUE DEPARCIEUX, 29
1946

DOYENS HONORAIRES :

MM. Balthazard, Baudouin, Roussy

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Aubertin, Balthazard, Basset, Baudouin, Bezançon, Brindeau, Carnot, Chevassu, Chiray, Clerc, A. Couvelaire, Delbet, Hartmann, Heitz-Boyer, Jeannin, Laignel-Lavastine, Laubry, Lemierre, Lenormant, Marion, Mulon, Ombrédanne, Roussy, Rouvière, Sannié, Sébilleau, Sézary, Tanon.

DOYEN	LÉON BINET.
	Membre de l'Institut
ASSESSEUR.	JEAN VERNE.

I. — PROFESSEURS

Anatomie	MM.
Anatomie pathologique	ff OLIVIER.
Assistance Médico-sociale	LEROUX.
Bactériologie	N...
Biologie médicale	GASTINEL.
Chimie médicale	VERNE.
Clinique de cardiologie	POLONOVSKI.
	DONZELOT.
	BROCC.
Cliniques chirurgicales	CADENAT.
	MONDOR.
	QUENU.
Clinique chirurgicale infantile et d'orthopédie	LEVEUF.
Clinique chirurgicale orthopédique	MATHIEU.
Clinique gynécologique	MOCQUOT.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies des enfants	DEBRE (R.).
Clinique des maladies infectieuses	ff MOLLARET.
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale ..	DELAY.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
	BENARD (H.).
Cliniques médicales	CHABROL.
	HARVIER.
	LIAN.
Clinique médicale propédeutique	P. VALLERY-RADOT.
Clinique de Neuro-chirurgie	VINCENT (Cl.).
	LANTUEJOUL.
Cliniques obstétricales	LEVY-SOLAL.
	PORTES.
Clinique ophtalmologique	VELTER.
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	SENEQUE.
Clinique thérapeutique médicale	LOEPER.
Clinique de la Tuberculose	BERNARD (Et.).
Clinique urologique	FEY.
Embryologie	GIROUD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	ALAJOUANINE.
Histologie	CHAMPY.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	BESANCON (JUSTIN)
Hygiène et clinique de la première enfance	CATHALA.
Hygiène et médecine préventive	JOANNON.
Médecine du Travail	DUVOIR.
Médecine légale	PIEDELIEVRE.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT (E.).
Pathologie chirurgicale	PETIT-DUTAILLIS.

Pathologie exotique	MM.
Pathologie expérimentale et comparée	LAVIER.
Pathologie médicale	LEMAIRE.
Pathologie et thérapeutique générales	MOREAU.
Pharmacologie et matière médicale	ff DE GENES.
Physiologie	HAZARD.
Problèmes alimentaires (<i>chaire à titre personnel</i>) ..	BINET (Léon).
Puériculture	RICHET (Charles).
Radiologie médicale	LELONG.
Stomatologie	DESGREZ (H.).
Physique médicale	DECCHAUME.
Technique chirurgicale	STROHL.
Thérapeutique	MOULONGUET.
	LAROCHE (G.).

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. DOGNON (*Physique médicale*), GAILLARD (*Parasitologie*),
HALPHEN (O. R. L.); JAYLE M. (*Chimie médicale*),
Mlle J. LEVY (*Pharmacologie*), OLIVIER (*Anatomie*),

II. — AGREGES EN EXERCICE

MM.		MM.	
Anatomie	CORDIER.	Pathologie chirurgicale ..	PADOVANI.
	DELMAS.		PATEL.
	N. ff DEBEYRE.		ROUX.
Anatomie pathologique ..	DELARUE.		RUDLER.
	Mlle GAUTHIER- VILLARS.	Pathologie expérimentale .	SICARD.
Bactériologie ..	BONNET.		MERKLEN.
	FASQUELLE.	Pathologie médicale	BROUET.
Biochimie médicale	ETTORI.		CACHERA.
	SCHAPIRA.		DECOURT.
Dermato syphillographie .	DEGOS.		DREYFUS (G.).
			FAUVERT.
Histologie	COUJARD.		GARCIN.
	DESCLAUX.		HAMBURGER.
Hydrologie	DEBRAY.		KOURILSKY.
			LAMY.
Hygiène	BOYER.		LENEGRE.
	DEPARIS.		MARCHAL.
Médecine légale.	DESOILLE.		MAURIC.
Neurologie . ..	DE SEZE.		SOULIE.
		Pédiatrie	LAPLANE.
	DIGONNET.		MARIE (J.).
	MAYER.	Pharmacologie..	CHEYMOL.
Obstétrique . ..	SUREAU.		BARGETON.
	VARANGOT.	Physiologie . ..	PARROT.
Ophtalmologie ..	OFFRET.		
		Physique médicale	DJOURNO.
Oto-rhino- laryngologie ..	AUBIN.		BARUK.
Parasitologie. ..	BRUMPT, L. C.	Thérapeutique	
	FEVRE.		
Pathologie chirurgicale. ..	HUGIER.	Agr. ch. d'ens. .	BROUET.
	LEGER.		
	MERLE d'AUBIGNÉ	Urologie	COUVELAIRE, R.

III. — PROFESSEURS HONORAIRES ET AGREGES RAPPELES A L'EXERCICE POUR LE SERVICE DES EXAMENS

MM. BASSET (*Pathologie chirurgicale*), BRINDEAU (*Obstétrique*),
HUGUENIN (*Anatomie pathologique*), LE LORIER (*Obstétrique*),
VAUDESCAL (*Obstétrique*).

IV. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE à titre permanent.

	MM.		M.
Clinique chirurgicale ...	AMELINE.	Clinique médicale	DE GENNES.
	BASSET.		HAGUENAU.
	DE GAUDART		MOLLARET.
	D'ALLAINES.		MOUQUIN.
	FUNCK-BRENTANO.	Clinique obstétricale . . .	TURPIN.
Clinique médicale	GATELLIER.		ECALLE.
	MENEGAUX.	Clinique ophtalmologique Clin. otho-rhino- laryngologique	LACOMME.
	BARIETY.		RENARD.
	BOULIN.		HALPHEN.
	CHEVALLIER.		
	COSTE.		

V. — CHARGES DE COURS

M.

Radiologie LEDOUX-LEBARD.

MM.

Secrétaire de la Faculté J. MOREL.
Secrétaire-adjoint M. BRISSIAUD.

Bibliothécaire en Chef .. D^r A. HAHN.

Bibliothécaires Mlles DUMAITRE, GOICHON, LAURENT.

*Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les
opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être
considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner
aucune approbation ni improbation.*

A MES PARENTS

A MA SŒUR

A MES FRÈRES

A MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR LOEPER

Professeur de la Chaire de Clinique Thérapeutique Médicale
de l'Hôpital Saint-Antoine

Commandeur de la Légion d'Honneur

Membre de l'Académie de Médecine

Hommage respectueux.

A NOS MAITRES

MONSIEUR LE DOCTEUR HENRI-RENÉ OLIVIER

Ex-Professeur de Clinique Médicale à Dijon
Ex-Chargé de cours à la Faculté de Médecine de Paris

MONSIEUR LOUIS DE SAINT RAT

Chef de travaux pratiques à la Faculté des Sciences de Paris

MONSIEUR LE DOCTEUR PIERRE GRABAR

Chef de service à L'Institut Pasteur

*Ils trouveront ici l'expression de ma
profonde reconnaissance.*

A NOS MAÎTRES DANS LES HOPITAUX

MONSIEUR LE PROFESSEUR DALOUS (Hôtel-Dieu de Toulouse).

MONSIEUR LE DOCTEUR E. SORREL.

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. LANTUEJOUL.

MONSIEUR LE DOCTEUR L. RAMOND.

MONSIEUR LE DOCTEUR R. BENDA.

MONSIEUR LE PROFESSEUR B. FEY.

MONSIEUR LE DOCTEUR G. LOISEAU.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. DEBRE.

A MONSIEUR LE DOCTEUR L. CLEISZ.

A MONSIEUR LE DOCTEUR G. ALBOT.

A MONSIEUR LE DOCTEUR R. DESNOYERS.

*Qui ont bien voulu nous ouvrir leur
service pour la partie clinique de cette
thèse.*

INTRODUCTION

La thérapeutique anti-infectieuse s'inspirait, avant PASTEUR, des données empiriques, léguées par les sorciers, barbiers et médecins, données qui étaient religieusement transmises de générations en générations.

Avec l'ère pasteurienne, la médecine acquiert la notion de l'origine microbienne des infections; la thérapeutique s'oriente alors vers la lutte spécifique, contre le germe propre à chacune de ces infections : la vaccinothérapie et la sérothérapie sont les premières armes réellement efficaces contre les microbes, mises à la disposition du thérapeute.

La grande variété des germes infectieux et la complexité des états qu'ils provoquent lorsqu'on les injecte dans un organisme n'ont pas permis de trouver un agent immunisant pour toutes les infections; les progrès de la chimie organique ont orienté alors les chercheurs vers une chimiothérapie de synthèse : les sulfamides ont couronné leurs efforts.

Là encore, le thérapeute se heurte à de nouvelles difficultés. De nombreux germes ne sont pas attaqués; d'autres s'habituent et ne réagissent plus. Les antibactériens de synthèse qui constituaient seuls jusqu'alors les agents chimiothérapeutiques (c'est-à-dire les agents requérant à la fois l'activité in vivo contre les germes et l'innocuité à l'égard de l'organisme animal) sont relayés aujourd'hui par les anti-bactériens d'origine naturelle : la pénicilline efface une partie des infections bactériennes du tableau des « maladies incurables », et selon un mécanisme toujours renouvelé dans l'histoire des sciences, suscite une floraison de substances anti-bactériennes, extraites des organismes les plus variés.

Au nombre de ces organismes figure *Bacillus subtilis*, une bactérie aérobie commune, bien connue pour son activité fermentative et dont les propriétés lytiques avaient déjà été mises en évidence à la fin du siècle dernier. Ses propriétés l'avaient signalé à l'attention des auteurs H.-R. OLIVIER et L. DE SAINT RAT travaillant en équipe avec P. BONET-MAURY et E. BLANCHON, aux soins de qui nous devons de présenter aujourd'hui cette thèse.

La notion thérapeutique qui a servi de point de départ aux auteurs est celle qui a fait préconiser l'emploi des ferments lactiques et du bacille bulgare dans les infections intestinales; les résultats parfois surprenants, obtenus par ingestion de cultures séchées du bacille subtil, ont conduit à étudier son mode d'action; rapidement se sont alors succédées les observations de lyse du colibacille, des bacilles typhiques et paratyphiques, du streptocoque, du staphylocoque et enfin du bacille tuberculeux (souche ARLOING et COURMONT), l'extraction de la substance active a suivi presque immédiatement et la purification se poursuit.

Il s'agit donc là d'un cas d'antagonisme microbien; les germes lysés, Gram positifs, Gram négatifs et bacilles acido-résistants, la non-toxicité du bacille et de ses extraits enfin, confèrent à ce nouvel antibiotique une importance particulière, qui apparaît de façon évidente lorsqu'on compare son domaine d'action et sa toxicité à celle des anti-biotiques actuellement connus.

Cet exposé comportera une partie bibliographique, une partie expérimentale (recherches faites par les auteurs précités et par nous-même) et une partie clinique.

Nous nous efforcerons, au cours de deux chapitres d'historique, de marquer les progrès de la notion thérapeutique envisagée ici en signalant les apports des disciplines adjacentes.

Nous exposerons ensuite les différents problèmes qui se sont alors posés et que nous avons cherché à résoudre expérimentalement, au sujet du mode d'action du bacille subtil et de la méthode d'extraction de la propriété active, nous réservant un chapitre pour étudier spécialement le comportement du bacille subtilis à l'égard du bacille tuberculeux.

Nous envisagerons enfin les possibilités thérapeutiques offertes par les substances antibiotiques actuellement utilisées et décrirons les résultats cliniques obtenus chez des malades traités par ingestion de culture de bacille subtil.

PLAN

I. — Historique bref de l'antagonisme microbien, en insistant sur les premiers travaux qui ont permis d'asseoir cette notion.

II. — Historique de la découverte des propriétés biologiques et particulièrement lytiques du bacille subtil, que nous ferons suivre d'un bref exposé des propriétés analogues trouvées chez les bactéries du groupe subtilis pour marquer qu'il ne s'agit pas là d'un phénomène particulier mais bien général que l'on a pu même « provoquer ».

III. — Recherches expérimentales sur le mode d'action de *B. subtilis*.

IV. — Technique actuelle d'extraction de la substance active, à partir du voile microbien.

V. — Résumé des notions actuellement acquises sur les substances anti-bactériennes du bacille tuberculeux.

VI. — Tableau comparatif de l'activité des différents antibiotiques connus actuellement.

VII. — Présentation de quelques cas de malades traités par ingestion de voile de *Bacillus Subtilis* humide ou desséché : diarrhées et colibacilloses.

VIII. — Conclusions.

CHAPITRE I

DE L'ANTAGONISME MICROBIEN

— En guise d'introduction, nous rappellerons les premiers travaux qui ont permis d'envisager une thérapeutique par les microbes, et particulièrement leur pouvoir lytique.

— Dès 1877, la possibilité d'une telle thérapeutique était envisagée par PASTEUR, à propos de ses observations sur la maladie du charbon :

« On peut introduire à profusion dans un animal la bactérie charbonneuse sans que celui-ci contracte le charbon. Il suffit qu'au liquide qui tient en suspension la bactérie, on ait associé en même temps des bactéries communes ». Il s'agit là, pense-t-il, d'une manifestation de la lutte pour la vie « chez les êtres inférieurs plus encore que dans les grandes espèces animales ou végétales, la vie empêche la vie ».

— PASTEUR réalisa par la suite le premier essai de bactériothérapie : il rend les poules réfractaires au charbon en les vaccinant contre le choléra des poules. Il immunise ainsi contre une maladie au moyen d'une maladie d'une toute autre nature.

— « Si ce résultat se confirme et s'il se généralise pour d'autres maladies virulentes, on pourra en espérer les conséquences thérapeutiques les plus importantes », écrivait alors PASTEUR.

— La voie ainsi tracée par PASTEUR devait être suivie par quelques chercheurs qui précisèrent peu à peu l'action réciproque de certains microbes et posèrent la notion d'antagonisme microbien.

— Et tout d'abord, EMMERICH pour le streptocoque de l'érysipèle, PAWLOWSKY pour le bacille de FRIEDLANDER et le micrococcus prodigiosus, BOUCHARD pour le bacille du pus bleu, démontrent l'inhibition du développement des bactériidies charbonneuses.

— FREUDENREICH (1888) (29) étudie la prolifération des microbesensemencés dans des milieux de culture où se sont développés au préalable des microbes de même espèce ou d'espèce différente, après élimination de ces derniers. Il constate que certains microbes exercent à l'égard d'autres un pouvoir réellement nocif : ainsi le bacille pyocyanique et *bacillus phosphorescens* réduisent dans une forte proportion, quand ils ne l'inhibent pas, le développement des microbes que l'on implante dans les milieux où ils ont crû. D'autres microbes, sans avoir une action inhibitrice aussi étendue vis-à-vis des différentes espèces de la flore microbienne, accusent cependant un pouvoir inhibiteur particulier à l'égard de certaines d'entre elles. Les microbes exercent donc une influence très variable sur le pouvoir nutritif des bouillons sur lesquels ils se sont développés.

D'autre part, certains microbes sont peu difficiles sur le choix de leur nourriture et s'accommodent de tous les bouillons qu'on leur offre; il s'agit généralement, remarque FREUDENREICH, de germes saprophytes.

Avant de conclure à un antagonisme réel, il faut donc bien examiner si le manque de croissance ne provient pas simplement de ce que l'on a affaire à un microbe très sensible à la composition de son milieu de culture. Il existe alors entre un antagonisme réel et une fonction de nutrition non satisfaite tous les intermédiaires, et rien ne permet de conclure à ce stade d'observation s'il s'agit :

- de l'absence d'un principe nutritif indispensable à une espèce microbienne à fonction de digestion dégénérée,
- d'un principe toxique dû à la fonction d'élimination,
- d'un principe nocif, résultat d'un équipement enzymatique très riche ou d'une fonction bien particulière de défense.

Nous retiendrons avec FREUDENREICH la possibilité de l'intervention de plusieurs facteurs plus ou moins intriqués, dans l'inhibition d'une culture microbienne, et sa définition de l'antagonisme microbien : « Le pouvoir que peuvent avoir certains microbes de rendre les milieux de culture dans lesquels ils ont vécu, impropres à la vie d'autres organismes ».

— CHARRIN (12), à la même époque, décrit le phénomène de la lyse microbienne, c'est-à-dire de la dissolution des microbes, observation essentielle car nous trouverons tout au long de l'histoire de l'antagonisme microbien des descriptions identiques.

On introduit quelques gouttes de culture du bacille pyocyanique dans une culture de charbon : on constate que la bactériodie charbonneuse change rapidement d'aspect; dès le second jour les bâtonnets rassemblent leur contenu sous forme de granulations, de volume variable, autour desquelles on aperçoit la mince membrane de la bactériodie. Après trois ou quatre jours, on observe soit des formes d'involution, consistant en bâtonnets ou filaments renflés, incurvés, soit des articles isolés ou soudés, réduits par place à leur membrane, renfermant ailleurs des granulations facilement colorables; si l'on ensemence après plusieurs mois ces organismes ainsi altérés, dans des milieux appropriés, la végétation normale ne tarde pas à apparaître.

Et CHARRIN résume ainsi l'action du bacille pyocyanique :

« Il atténue la bactériodie charbonneuse en sécrétant des substances nuisibles pour elle, également en épuisant les milieux nutritifs... il suffit d'ajouter du bouillon pur pour rendre au germe charbonneux un certain degré de vitalité ».

— L'expérience de BLAGOVESTCHENSKY (1890) (9), met en valeur un nouveau facteur dans l'action du bacille pyocyanique.

Il fait ressortir la participation de l'organisme infecté, en observant la lyse in vivo, dans la chambre antérieure de l'œil du lapin; il note alors une augmentation de l'activité des phagocytes qui sont bondés de bactéridies alors que le bacille pyocyanique, libre, entoure les leucocytes et les germes charbonneux. A la fin de la lyse, lorsque les bactéridies auront disparu

du champ, alors seulement les bacilles seront absorbés à leur tour.

— Le terrain est désormais préparé pour que GESSARD (33) apporte à cette série de travaux la conclusion pratique; il extrait la substance active, qui ne répondra pas aux espoirs thérapeutiques que l'on avait mis en elle mais qui constitue le premier produit actif contre des microbes, extrait d'un autre microbe.

De longs travaux aboutissent ensuite à l'isolement de la pyocyanase qui possède une action bactériolytique sur de nombreuses bactéries Gram positif et Gram négatif et la pyocyanine, pigment bleu qui est bactéricide à l'égard des bactéries Gram positif.

— L'histoire de l'antagonisme microbien est pour une grosse part, au cours de ces étapes longues et difficiles du début, celle du bacille pyocyanique; de nombreuses méthodes ont été étudiées qui aideront plus près de nous la mise au point de substances similaires.

C'est en effet une nouvelle ère thérapeutique qui débute maintenant. Parmi les végétaux inférieurs, les moisissures voient naître la pénicilline. Au palmarès des bacilles figurent déjà la pyocyanine, la gramicidine, pour ne citer que les principaux. De nombreux auteurs admettent aujourd'hui que cette activité lytique des végétaux inférieurs n'est pas une grâce particulière accordée à telle bactérie ou à telle moisissure, mais un principe général. Certains auteurs américains, après avoir étudié dans ce sens un certain nombre de variétés des espèces *Aspergillus* et *Penicillium*, précisent même qu'il suffit de trouver le milieu de culture adéquate pour provoquer la sécrétion du principe actif (WILKINS et HARRIS) (103).

*
**

— Moins connue et plus courte est l'histoire de la fonction microbienne antitoxique.

METCHNIKOFF (1897) (53) est amené à étudier ce problème lorsqu'ayant déjà étudié le rôle de la phagocytose, il essaie de synthétiser les moyens de défense de l'organisme, en parcou-

rant l'échelle animale. Recherchant particulièrement l'influence de l'organisme sur les toxines, il note que les bactéries et les champignons inférieurs agissent le plus souvent en affaiblissant les toxines et il donne la première place dans cet ordre de fait au bacille subtil.

La fonction antitoxique des bactéries est donc connue depuis la fin du siècle dernier.

On a reconnu de même au bacille pyocyanique le pouvoir de neutraliser en partie la toxine diphtérique (21) ; et nous verrons dans un autre chapitre que des travaux récents semblent préciser cette fonction antitoxique chez le bacille subtil (72).

*
**

— Nous ne quitterons pas ce chapitre de généralités sans avoir rappelé l'histoire du bacille bulgare ; il s'agit ici d'utiliser une fonction physiologique bien différente des précédentes, et moins spécifique. On se propose d'utiliser les propriétés fermentatives de certaines bactéries afin de suppléer aux insuffisances de la fonction intestinale :

En 1908, lorsque METCHNIKOFF (54) prescrivit l'emploi de laits acides, le bacille bulgare fut consommé sous de nombreuses formes par les malades ; on attribuait à cette bactérie le pouvoir de déplacer la flore microbienne intestinale du fait de sa capacité à produire des acides de fermentation et, en arrêtant la putréfaction intestinale, faire cesser les troubles dus à l'auto-intoxication par absorption ; la constipation était le principal symptôme traité de cette manière.

Certains travaux ont permis de sélectionner des souches de bacille acidophile plus apte à s'établir dans l'intestin.

*
**

On peut donc envisager trois ordres de traitements par les microbes :

1) Traitement d'affections intestinales en se basant sur les propriétés fermentatives de certains microbes ; cette thérapeutique a pu être mise en pratique dès sa conception.

2) Traitement anti-infectieux et

3) Traitement anti-toxique au moyen de substances lytiques sécrétées par des bactéries; mais il a fallu pour entrevoir ces possibilités qu'une évolution se produise dans les conceptions thérapeutiques. Les quelques travaux préliminaires que nous avons cités ont contribué grandement à créer l'atmosphère nécessaire à la découverte des anti-bactériens d'origine naturelle devenus « indispensables » aux praticiens d'aujourd'hui.

CHAPITRE II

DE L'ANTAGONISME DE "BACILLUS SUBTILIS"

HISTORIQUE.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que du point de vue de la thérapeutique par les bactéries et par leurs sécrétions, on peut faire appel aux propriétés fermentatives, antitoxiques et lytiques de ces organismes.

Cette classification artificielle puisqu'elle ne s'adresse qu'à un seul caractère, la nature biochimique du matériel organique que l'on veut modifier (composants ternaires ou quaternaires, toxines, bactéries vivantes), est de plus arbitraire : les récentes recherches de chimie bactérienne, qui ont reçu une nouvelle impulsion à la suite de la découverte des antibactériens naturels, ont permis d'entrevoir la possibilité de faire apparaître ou disparaître dans certaines limites, telle ou telle de ces propriétés. Les enzymes adaptatifs sont devenus une notion courante pour ceux qui étudient les propriétés enzymatiques des organismes inférieurs en fonction des substrats utilisés et des divers autres facteurs extérieurs (18). Nous avons d'autre part cité WILKINS et HARRIS (103), qui assurent pouvoir obtenir des substances antibactériennes à partir de variétés inactives d'*Aspergillus* ou de *Penicillium* en modifiant simplement le milieu de culture en fonction de la biologie de la moisissure, s'accordant ainsi avec de nombreux auteurs; SCHILLER (1925) (84) avait déjà en effet vérifié cette hypothèse en créant des « antagonistes provoqués ».

Il est donc difficile dans un exposé consacré aux propriétés biologiques du bacille subtil d'essayer de classer les observations des différents auteurs dans telle ou telle catégorie d'activité; nous nous en remettons alors au caprice de la succession chronologique des travaux qui nous sont parvenus, caprice qui n'est d'ailleurs qu'apparent, car les époques sont dominées par des idées maîtresses qui orientent les hypothèses de départ des observations et des expériences.

Quels sont tout d'abord les facteurs qui ont pu attirer l'attention des chercheurs sur l'organisme que nous étudions ici ? Un bref résumé de généralités va nous permettre de le mieux comprendre.

Le bacille subtil est un aérobie commun; il a été identifié par EHRENBURG dans une infusion de foin. Très répandu dans la nature, on le trouve dans l'air, l'eau et les couches superficielles du sol; là on lui attribue un rôle très actif dans les décompositions végétales avec d'autres bactéries dont certaines très semblables ont été classées dans un même groupe (groupe de bactéries aérobies sporogènes); il s'agit de *Bacillus mesentericus*, *Bacillus Megatherium*, *Bacillus Mycoïdes*, *Bacillus Anthracis* et quelques autres, pour lesquels on a pu décrire des propriétés antimicrobiennes et enzymatiques semblables (quoique atténuées), à celles rencontrées chez *Bacillus subtilis*.

LEMOIGNE (47), dans sa thèse datant de 1913, souligne l'importance du groupe Subtilis-Mesentericus dans les fermentations naturelles et signale sa prédominance dans des lits percolateurs et le sol; il rappelle qu'il participe aux processus de dégradation et de minéralisation des matières organiques dans l'attaque des composés azotés et ternaires.

D'une façon plus pratique, ce n'est point tant son rôle dans le métabolisme végétal qui fait à l'ordinaire porter l'attention sur lui, mais son caractère de parasite tenace des laboratoires où il pollue les préparations et solutions organiques, en particulier; le bacille subtil est un indésirable dans les laboratoires de biologie et de chimie et c'est à ce titre surtout qu'il est connu, partageant en cela la réputation d'autres microbes et moisissures.

Seules les industries fromagères et textiles ont su apprécier et discipliner ses propriétés promues au rang de vertus.

Sa fréquence, son pouvoir protéido-lytique, et surtout amyolytique, le signaient donc naturellement à l'attention des observateurs et des expérimentateurs.

Nous ne pouvons entreprendre ici le problème de l'identification du bacille subtil, parce qu'il n'a pas reçu de solution définitive et qu'il se présente comme très complexe; signalons pour en montrer la délicatesse, que le *Tyrothrix scaber* de ROSENTHAL (1925) (75), décrit pour ses propriétés lytiques étendues, a pu être identifié par la suite à *Bacillus subtilis*; que *Bacillus subtilis* a pu être identifié à *Bacillus vulgatus* d'une part et à *Bacillus mesentericus niger* d'autre part, selon la souche étudiée (COHN (14) pour le premier — FORD (26) pour le second; GILSON (1944) (34); que certains auteurs ont pu transformer une souche normalement achromogène de bacille subtil en une variété chromogène.

Classiquement, le bacille subtil s'isole à partir d'infusion de foin, portée à l'ébullition pendant trente minutes; les spores sont spécialement résistantes à cette température.

Le dernier congrès de microbiologie américain a cependant défini *Bacillus subtilis* comme répondant aux caractéristiques de la souche isolée par COHN.

Les deux caractères essentiels attribués au groupe subtilis mesentericus vulgatus sont, sur milieu glucosé, d'une part la production d'acétyl méthyl carbinol (34) et, d'autre part, l'absence de production d'acide B. oxybutyrique : ce dernier point le distingue du groupe megatherium qui produit cet acide.

*
**

— L'idée thérapeutique essentielle, qui reçoit son application aujourd'hui, se trouve déjà en germe dans l'étude de PASTEUR (67) sur l'immunité charbonneuse, que nous avons citée plus haut; peut-être même les quelques lignes qui suivent et qui sont extraites de cette étude, se rapportent-elles au bacille subtil.

— « Si au moment de déposer dans l'urine les bactériidies charbonneuses à titre de semence, on sème en outre un organisme aérobie, par exemple une des bactéries communes, la bactériidie charbonneuse ne se développe pas ou très peu ».

— Le bacille subtil fut formellement mis en cause pour la première fois par METCHNIKOFF en 1897 (57), qui attire l'attention sur son pouvoir antitoxique; le problème proposé par METCHNIKOFF est celui de l'influence générale des organismes sur les toxines et plus particulièrement la détermination du stade évolutif auquel apparaît, dans l'échelle animale, le pouvoir de réagir à l'introduction d'une toxine par la fabrication d'une anti-toxine spécifique; étudiant l'action des organismes inférieurs sur les toxines, il note que champignons et bactéries ne sont pas doués du pouvoir de s'immuniser contre ces toxines, mais qu'ils les affaiblissent en les inhibant. Il donne la première place dans cet ordre de fait au bacille subtil : le bacille qui a végété pendant un certain nombre de jours sur le bouillon tétanique affaiblit d'une façon notable la toxine tétanique.

Fait essentiel, ce pouvoir n'est pas spécifique.

Madame METCHNIKOFF constate, entre autres, que le bacille détruit même l'abrine, toxine végétale beaucoup plus stable que les toxines microbiennes expérimentées plus haut.

• Le bacille subtil possède donc un pouvoir très prononcé. Le phénomène de lyse, par contre, n'est pas mentionné et c'est NICOLLE (1907) (56) qui le décrit le premier. Il ajoute à une suspension microbienne une culture du bacille subtil et, dans une autre série d'expériences, des filtrats de culture : dans les deux cas, la clarification de la suspension s'effectue de la même manière; et il en est ainsi aux dépens du pneumocoque, du bacille de la morve, du bacille typhique, de la bactériidie charbonneuse et du bacille de Shiga.

La substance lytique diffuse donc dans le milieu de culture où elle agit directement. Les conditions de l'expérience sont les suivantes : la culture du bacille subtil se fait sur bouillon peptoné à 2 %; les filtrats acquièrent leur maximum d'activité lytique vers le quatrième jour de la culture.

L'application immédiate qu'envisage NICOLLE n'est pas celle

qu'une telle observation entraînerait aujourd'hui; NICOLLE cherche à obtenir un lysat-vaccin anti-pneumococcique alors qu'aujourd'hui on envisagerait l'utilisation directe de la propriété lytique dans l'organisme infecté. Mais les conceptions nouvelles ont besoin, pour naître, d'un milieu favorable; or, l'ambiance n'est pas encore créée à cette époque pour permettre la conception d'agents antimicrobiens de nature chimique ou toxinique introduits directement dans la circulation. Tout au contraire, l'ambiance est alors soumise aux idées de la thérapeutique pasteurienne spécifique des infections.

Les trois observations qui suivent donnent au sujet toute son ampleur; elles se rapportent en effet à l'inactivation d'un infusoire (organisme inférieur plus évolué) d'un virus (organisme le plus simple connu actuellement) et de *mycobacterium tuberculosis* : l'action antimicrobienne du bacille subtil s'appliquant dans ce cas au bacille pathogène connu pour être le plus résistant aux agents chimiques, permet de présumer de la puissance de cette action.

— LEVADITI (1911) (48) découvre dans les produits de sécrétion du filtrat d'une culture de bacille subtil une trypanotoxine; la toxicité est maximum vers le troisième jour. Cette toxine se révèle active contre le trypanosome nagana.

LEVADITI étudie ensuite le processus d'intoxication du trypanosome.

Il pense que cette action ne s'exercerait pas selon un mode direct; la trypanotoxine a une affinité marquée pour certaines cellules de l'organisme qui la fixent et l'immobilisent : les cellules cérébrales, spléniques et rénales en seraient les vecteurs essentiels chez le cobaye; d'autre part, l'existence de trypanosomes toxo-résistants est attribuée à un défaut de fixation de la toxine sur les tissus. La trypanotoxine est trypanocide.

De cette étude nous retiendrons donc :

1) — la parenté éloignée de l'organisme mis en cause ici avec les micro-organismes précédemment envisagés;

2) — la possibilité de la fixation tissulaire de cette toxine précédant son action trypanocide.

A. MARIE (1925) observe qu'une exposition à 38° pendant quelques heures d'un mélange à parties égales d'une émulsion centésimale de virus rabique et de culture du bacille subtil ou de son filtrat, enlève au virus tout pouvoir de provoquer la rage quand on l'injecte dans le cerveau; un chauffage préalable du même mélange au-dessus de cent degrés lui conserve dans les mêmes conditions ses propriétés infectantes.

CHASSIGNEUX (13) a tout récemment redécouvert cette propriété du bacille subtil en cherchant la cause de l'échec de l'inoculation du virus rabique à des lapins.

VAN CANNEYT (1926), reprenant l'idée de VAUDREMER de modifier les propriétés virulentes du bacille tuberculeux au moyen d'une macération d'*Aspergillus fumigatus*, fait pousser le bacille subtil sur les colonies tuberculeuses de pomme de terre; le bacille se développe dans ces conditions, de préférence au niveau de ces colonies qu'il désagrège; lorsqu'on inocule ensuite au cobaye ou bien une culture de bacilles tuberculeux ayant subi pendant trente jours l'action du bacille subtil, ou bien une émulsion de bacilles tuberculeux humains ayant subi vingt-cinq jours le contact du bouillon épuisé par lui, on constate une survie prolongée et un taux de mortalité moindre dans le lot de cobayes que dans un autre lot traité avec une macération de moins de dix jours. Les cultures obtenues après un contact inférieur à quinze jours sont donc pleinement virulentes.

Par ailleurs, les ganglions des cobayes résistants, prélevés et inoculés sur des cobayes neufs ne provoquent l'apparition d'aucune lésion tuberculeuse. Il s'agit donc d'une altération de la vitalité du bacille tuberculeux qui peut aller jusqu'à sa mort.

L'étude qui suit montre que les propriétés lytiques commencent à s'imposer. ROSENTHAL s'attache au problème des « lyso-bactéries » comme il les appelle et son choix se porte principalement sur *Tyrothrix scaber* (bactériacés identifiés par la suite à *B. subtilis*) et sur *B. mesentericus*. Il reconnaît surtout au premier une activité bactériolytique étendue, s'exerçant sur le pneumocoque, le staphylocoque, le vibrion cholérique, le bacille du colon, les paratyphiques A et B, les bacilles de la dysenterie et du charbon et il attribue cette activité à des enzy-

mes protéolytiques d'une structure spéciale, s'attaquant particulièrement à la membrane des bactéries : il fonde son hypothèse sur le fait que de nombreux autres microbes, possédant une action protéolytique très prononcée n'ont aucun pouvoir antimicrobien et sur l'observation du phénomène d'agglutination qui précède parfois la lyse. Ce fait revêt une certaine importance du point de vue de la lyse « in vivo », car il semble prouvé aujourd'hui que certaines bactéries pathogènes virulentes sont lysées facilement par les phagocytes, lorsque la membrane des cellules bactériennes a pu être modifiée par des substances spécifiques.

Le phénomène « d'antagonisme provoqué », décrit par SCHILLER (84), n'apporte pas de données pratiques plus immédiates mais souligne l'influence du milieu de culture sur la sécrétion des propriétés bactériolytiques, ramenées d'ailleurs à des propriétés protéolytiques. SCHILLER cherche à « forcer » certaines bactéries choisies d'après leur activité enzymatique de façon à les rendre « antagonistes » à l'égard d'autres bactéries choisies également; il met des organismes protéolytiques dans des conditions de nutrition telles (suppression d'azote nutritif dans le milieu) qu'ils sont obligés de faire appel à leurs propriétés lytiques pour se nourrir aux dépens d'autres organismes seulement pepto-lytiques; au nombre des microbes protéolytiques utilisés figurent : *B. mesentericus*, *B. subtilis*, *B. anthracis*, qui, dans les conditions indiquées, lysent activement le streptocoque et le pneumocoque particulièrement. Après élimination des microbes du liquide de culture, celui-ci est utilisé à nouveau pour ensemencement des mêmes microbes peptolytiques qui sont à nouveau lysés. Il s'agit donc bien d'une substance bactériolytique contenue dans le filtrat de culture de bactéries protéolytiques. Cette substance bactériolytique est thermolabile : elle est détruite par un chauffage à 56-57° C., mais ne perd rien de son activité par dessiccation et évaporation à l'étuve. En résumé, d'après cet auteur, la digestion des bactéries vivantes par « antagonisme provoqué » se produit de la même façon que la digestion des substances protéiques insolubles par les bactéries, c'est-à-dire par sécrétion d'une substance protéolytique.



Le traitement des infections est encore à cette époque orienté principalement vers la recherche d'une immunisation spécifique des organismes infectés soit au moyen des vaccins, soit au moyen des sérums. La tentative de NICOLLE (56) que nous avons signalée plus haut, visait à l'obtention de vaccins à partir de germes lysés. Le perfectionnement des méthodes vaccinales est réalisé de deux manières : d'une part, la diminution de toxicité des vaccins (les anatoxines sont de 1923), et d'autre part, l'augmentation du taux de l'immunisation des sérums. En marge de ces études qui découlent normalement des idées pastoriennes, les observations se font plus fréquentes des phénomènes d'antagonisme (*B. pyocyannique*, *B. subtilis* et *mesentericus*, *A. fumigatus*, *Streptothrix*...). La généralité de ces phénomènes est notée particulièrement par CRATIA (1924) en ce qui concerne l'antagonisme naturel, et par SCHILLER en ce qui concerne l'antagonisme provoqué.

L'emploi thérapeutique de la pyocyanase de GESSARD (33) (35), depuis la première application faite par FORTINEAU (27) dans la maladie du charbon, n'a pas été généralisée aux antagonistes nouvellement dévoilés; on ne croit pas encore à la réalisation d'une « immunité chimique »; la pyocyanase reste en effet une toxine : son application a pu donner lieu à des accidents de toxémie et de chocs : précurseur de la pénicilline, la pyocyanase n'a pas de suite immédiate et devant l'observation des phénomènes d'antagonisme, le but reste pour de nombreux auteurs « l'obtention d'une réaction de défense au moyen d'un lysat microbien » (DUCHON) (21). Nous voyons cependant chez VAUDREMER (96), outre la préoccupation constante d'obtenir un vaccin anti-tuberculeux au moyen de bacilles modifiés l'espoir d'utiliser directement la propriété antibacillaire contenue dans les macérations d'*Aspergillus fumigatus*; il faudra attendre l'ère thérapeutique inaugurée par la découverte de FLEMING (25) pour assister à la préparation de produits actifs contre le bacille tuberculeux — Aspergilline de SOLTHYS (1944) (90) — Extrait de ASHESHOW et STRELITZ (1945) (4) — sans compter d'autres essais. L'extraction de la pénicilline purifiée a de même été pré-

cée d'une période de stagnation : en 1928, date à laquelle la notion d'un agent antimicrobien puissant était acquise, aucun agent chimique anti-microbien n'a été découvert, mais l'atmosphère est complètement changée quelques années plus tard, lorsque les sulfamides ayant fait leur apparition on sait désormais qu'un agent chimique est capable d'affecter un micro-organisme virulent à l'intérieur de l'organisme infecté; la tendance qui était à l'immunité vaccinale s'oriente vers « l'immunité chimique ».

La substance anti-microbienne de *B. subtilis* bénéficiera des possibilités offertes par cette évolution thérapeutique.

Les travaux d'ALEXOPOULOS (1) qui décrit l'antagonisme de quelques bactéries (dont *B. subtilis*) à l'égard de plusieurs champignons (OHIO (1938), de BITTER et RAYMOND (8) sur l'antagonisme de diverses bactéries sporulées (*B. subtilis*, *B. megatherium*, *B. mycoïdes*) à l'égard du staphylocoque et du *B. de Shiga* (Wyoming Academy, 1941) et d'un auteur italien LANFRANCHI (45) sur la résistance des rats traités par des cultures de *B. subtilis*, ou par les polysaccharides qui en sont extraits, à l'égard de *Salmonella typhimurium* et de *Pasteurella aviseptica*, mettent en relief la diversité d'origine de l'observation des propriétés antibiotiques développées par *B. subtilis*.

— 1944 : JANSEN et HYRSCHMANN (Californie) (39) isolent du *Bacillus subtilis* une substance anti-bactérienne qu'ils dénomment « Subtiline » et qui est active surtout contre les bactéries qui ne se décolorent pas au Gram.

La subtiline brute est extraite à partir de cultures de bacilles poussés sur un milieu à l'asparagine; cette culture est ajustée à pH 4,7, ce qui provoque une précipitation. Le précipité recueilli par centrifugation et qui contient des débris cellulaires et des cellules intactes est séché et réduit en poudre; celle-ci est remise en solution acidifiée à pH 2,7, afin d'en déterminer l'activité; on constate alors qu'une grande partie de l'activité de la culture initiale est retenue.

La purification de la substance active à partir de la poudre sèche est faite de la manière suivante : la poudre est reprise par l'alcool à 95° à chaud, pendant une demi-heure; quand cette

poudre est préalablement mouillée avec une petite quantité d'eau, la plus grande partie de l'activité passe en solution; la substance active qui se trouve en solution éthylique est alors précipitée doucement par addition de deux volumes d'une solution de chlorure de sodium de 1 %. Elle peut être précipitée plus rapidement par addition des deux volumes d'eau que l'on ajuste à pH 2,7.

— *Propriétés.* — Ce précipité final inhibe les micro-organismes servant de test (ici les *micrococcus conglomeratus*) en concentration de 0,06 à 1 γ par cc.;

- ce précipité contient 5,7 % d'azote;
- il donne une coloration bleue intense lorsqu'on lui ajoute une petite quantité d'une solution alcoolique de chlorure ferrique;
- le réactif de FOLIN dénote de plus la présence de substances phénoliques (33 % d'après ces auteurs);
- la poudre obtenue finalement perd son activité rapidement lorsqu'elle est conservée à une température de cinq degrés; il en est de même lorsqu'elle est conservée en solution alcoolique à la même température;
- l'action de la lumière lui fait perdre 90 % de son activité.

Ces différentes propriétés et sa sensibilité à la chaleur à pH 8 suggèrent aux auteurs une similitude entre la subtiline et la pénicilline.

— Dans le même temps, trois groupes de chercheurs français travaillant isolément redécouvraient les propriétés lytiques du *B. subtilis* à l'égard d'un matériel microbien différent :

1) — VALLÉE M. (94) constatait la lyse dans les cultures de certains bacilles anaérobies cultivés sous voile de *B. subtilis* (février 1945) et annonçait l'extraction d'une « subtilysine » calcique active, à partir des filtrats de culture.

2) — G. RAMON et RICHOU (71) étudiant les propriétés diastatiques de ce bacille étaient amenés à constater son pouvoir

antidotique in vitro à l'égard des toxines microbiennes et son pouvoir lytique vis-à-vis de certains microbes (mai 1945).

3) — OLIVIER, de SAINT RAT, BONET-MAURY, BLANCHON (57-65), recherchant la cause des bons résultats obtenus dans le traitement de diarrhées infectieuses, en particulier par l'ingestion de voile desséché de *B. subtilis* étaient amenés à constater l'action lytique de ce bacille vis-à-vis du colibacille, puis successivement vis-à-vis du *B. typhiques*, du staphylocoque, de streptocoque et d'une souche homogène de bacille tuberculeux.

— M. VALLÉE après l'observation initiale de la lyse de certains bacilles anaérobies (*Cl. chauvoei*, *Vibron septique*, *Cl. œdematiens*) cultivés sous voile de *B. subtilis*, essaie d'obtenir le principe lytique actif : le milieu de culture utilisé n'est pas précisé par cet auteur qui constate que le produit actif décelable dès le second jour de la culture atteint son maximum de production vers le vingtième jour; une simple filtration permet déjà d'obtenir un principe actif qui, stable à la température de 56° pendant une heure, est détruit en une demi-heure à 80°. A la température ordinaire, ce principe peut se conserver de longs mois. Ce simple filtrat est, dans ces conditions, actif au 1 : 20 sur le colibacille, et *vibron septique*, *B. œdematiens*, les *salmonellas*, le *B. de Gartner*, et les *pasteurellas* énumérés par ordre décroissante de sensibilité. Des travaux ultérieurs du même auteur précisent les conditions d'extraction de la subtilysine.

La production de la subtilysine semble augmenter considérablement lorsque l'autolyse du *B. subtilis* commence à se produire, libérant le principe contenu dans les corps microbiens.

Cette autolyse peut s'obtenir facilement en provoquant l'inanition carbonée du *B. subtilis* (MONOD).

Après la filtration du milieu de culture qui en permet la stérilisation, la précipitation de la subtilysine alcaline brute par le chlorure de calcium à 10 % permet d'obtenir après lavage et dessiccation dans le vide, une poudre très active.

Le principe ainsi isolé peut être actif à 1 : 50.000, dilution à laquelle il agglutine le colibacille.

Il obtient par ailleurs une analysine très active par formolisation susceptible de concentration plus poussée; la stérilité et l'efficacité de ce produit permettraient d'envisager des études thérapeutiques.

— G. RAMON et R. RICHOU (71), reprenant les travaux ébauchés par M. NICOLLE (56) et METCHNIKOFF (53), portent leurs investigations sur les propriétés diastasiques des filtrats de culture de *B. subtilis*. Un premier travail leur permet de mettre au point un milieu de culture à bon rendement à base de son de blé.

Ils établissent ensuite un test d'activité gélatinolytique : il semble en effet, d'après ces auteurs, que l'activité gélatinolytique suit une courbe à peu près parallèle à celle des pouvoirs antitoxiques et antimicrobiens.

Les filtrats de culture obtenus possèdent des propriétés bactériostatiques, bactéricides et bactériolytiques à l'égard de divers facteurs pathogènes comme le bacille diphtérique, le B. de Preiss-Mocard, la bactériémie charbonneuse, le B. de la pseudo-tuberculose, le B. de la peste, le B. dysentérique (SHIGA).

Il résulte enfin d'une autre série d'expériences que les filtrats de culture sont capables d'altérer et même de détruire totalement la toxicité que possèdent in vitro et in vivo des toxines bactériennes telles que les toxines diphtériques, staphylococcique et tétanique. Ces faits, et d'autres étudiés ensuite, incitent ces auteurs, à voir dans l'antagonisme des filtrats de *B. subtilis* à l'égard de certaines bactéries et surtout de leurs toxines, des phénomènes de caractère diastasique.

— Des travaux de OLIVIER, de SAINT RAT, BONET-MAURY et BLANCHON nous ne donnerons ici que les grandes lignes; les conditions des expériences et de l'extraction feront l'objet d'un chapitre spécial. Nous avons dit que les observations initiales de ces auteurs sont cliniques et thérapeutiques; le côté expérimental a pris ensuite une place importante et permis en particulier de découvrir l'action de *B. subtilis* à l'égard des B. tuberculeux.

L'action escomptée dans les cas traités est tantôt une action substitutive (dans les diarrhées infectieuses ou les diarrhées par

déséquilibre de la flore intestinale) tantôt une action lytique (dans les colibacilloses urinaires). L'observation de l'évolution de la flore intestinale par culture des selles permet aux auteurs de constater une lyse partielle des germes. L'action lytique des bacilles est alors essayée avec succès sur le colibacille, le *B. typhique* et les paratyphiques, le staphylocoque, le streptocoque (57 et 58), et surtout sur la souche homogène ARLOING et COURMONT de bacilles tuberculeux humains (61).

Des essais d'obtention du produit actif à partir des milieux de culture donne des résultats moins intéressants que l'extraction à partir des corps microbiens; nous reviendrons aussi sur ces essais d'extraction.

— En Amérique : J.-B. SALLE étudie l'action antibiotique de la substance active de *B. subtilis* de JANSEN et HIRSCHMANN, sur les diverses bactéries.

Le test d'activité choisi par l'auteur est le suivant : on inocule 0,1 cc. d'une culture de microbes à expérimenter sur de l'agar en boîte de Pétri et on dépose 0,1 cc. d'une solution déterminée de subtilysine dans un cylindre d'agar — méthode de HEATLEY modifiée — de 1 cm. de diamètre, ou bien un petit disque de papier-filtre plongé préalablement dans la solution active. L'action inhibitrice se manifeste par une zone claire qui se forme autour du cylindre d'agar ou du disque du papier.

Les dilutions de subtilysine utilisées varient entre : 1 : 1.000 et 1 : 10.000.000. Les bactéries qui prennent le Gram sont beaucoup plus sensibles à son action que les bactéries qui ne gardent pas le Gram : ces dernières ne sont pas inhibées à la dilution de 1 : 1.000.

Le *mycobacterium tuberculosis*, inoculé en milieu de Lang auquel on ajoute des dilutions de subtiline variant entre 1 : 5.000 et 1 : 250.000, est mis à l'étuve à 37° pendant trois semaines. La subtiline semble être bactériostatique dans les dilutions élevées et bactéricide dans les concentrations plus fortes.

Tels sont les résultats actuels des derniers travaux réalisés en Amérique et qui nous sont parvenus; ils datent des derniers mois de 1945.

— Que reste-t-il de tous ces travaux ?

Le *B. subtilis* est doué d'une activité bactériostatique, bactéricide et bactériolytique in vitro, s'ajoutant à ses propriétés antitoxiques et enzymatiques.

Ces différentes propriétés ont été retrouvées par les auteurs à divers échelons chez les organismes inférieurs; l'activité bactériolytique est la plus soumise à contestations ou du moins à discussions. Selon les conditions de cultures, de souches bactériennes et d'extraction, on a pu obtenir des substances impures qui diffèrent par bien des points.

De cet exposé nous tirerons cependant les conclusions suivantes :

- 1) — Un fait d'ordre général : la découverte des propriétés bactériolytiques d'utilisation pratique presque immédiate sont ici, comme dans la plupart des découvertes, l'œuvre d'un certain nombre de chercheurs dispersés dans le temps et dans l'espace; nous avons vu que des auteurs ont redécouvert aujourd'hui ce que d'autres avaient trouvé il y a déjà quelques dizaines d'années, mais il lui a fallu pour arriver à maturité l'expérience accumulée par de patients et longs efforts. Il a fallu une certaine saturation pour arriver à cette cristallisation : la pénicilline.
- 2) — Du point de vue de la réalité et de l'étendue du pouvoir du *B. subtilis*, cet exposé des travaux qui ont été réalisés par des chercheurs travaillant le plus souvent isolément, chacun sur une petite portion du problème biologique général posé laisse supposer un équipement défensif et offensif d'une variété et d'une puissance exceptionnelles qui, vu l'état des recherches, permettent de bien augurer de son utilisation thérapeutique.

PROPRIETES ANTAGONISTES DU GROUPE AEROBIE SPOROGENE

Les propriétés antibiotiques ne sont pas le fait de quelques rares micro-organismes : le seul fait que les microbes pathogènes sont pour la plupart détruits dans le sol par un processus identique à celui que l'on observe lors de la décomposition végétale, indique que la propriété bactériolytique est largement répandue dans la nature : de nombreuses bactéries pathogènes croissent en effet sur un milieu de terre stérilisée mais ne survivent pas longtemps dans la terre fraîche normale. De nombreux auteurs (BOGENDORFER) (10) pensent pouvoir obtenir des substances antibiotiques à partir des bactéries en modifiant le milieu de culture selon la capacité digestive de chacune d'elles. Il ne faut cependant pas trop se hâter de généraliser : de nombreuses souches se rapportant à des espèces fortement antagonistes, n'ont jamais pu sécréter de substance active, lorsqu'on a modifié leurs milieux de culture. D'autre part, les bactéries représentent, du point de vue évolutif, les organismes les plus simples et les plus anciens ; beaucoup parmi elles sont devenues parasites des animaux et pathogènes, perdant au profit d'une spécialisation très poussée leur structure et leurs fonctions initiales ; il serait difficile d'admettre dans ces conditions que ces bactéries dégradées ont le même pouvoir de décomposition que des espèces restées relativement immuables comme celles qui ont toujours vécu dans le sol et celles qui s'imposent dans les eaux d'égouts. « Dans les fosses septiques, les lits percolateurs où les phénomènes de minéralisation sont intenses, il y a chance qu'une sélection se soit faite et que l'on trouve surtout les microbes dont le rôle naturel est le plus grand » (LEMOIGNE) (47).

Nous ne nous étonnerons pas dès lors de trouver de nombreuses bactéries antagonistes parmi les bactéries sporogènes qui vivent en particulier dans le sol ; mais on ne pourra prétendre trouver des propriétés semblables au sein de n'importe quel groupe de bactéries ou de micro-organismes. Parmi ces bactéries, les principales sont : *B. subtilis*, *B. mycoïdes*, *B. mesente-*

ricus, *B. brevis*. Le *B. subtilis* a été étudié précédemment et nous n'y reviendrons pas dans ce chapitre.

— DUCLAUX (22) signale dès 1887 une bactérie de ce groupe, isolée du fromage de Cantal et qu'il appelle Tyrothrix.

— PRINGSHEIM (69) (1920) isole une souche de *B. mesentericus-vulgatus*, active en particulier contre *Corynebacterium diphtherial* dont il inhibe la croissance.

— ROSENTHAL (1925) (75) étudie l'action lytique de *Tyrothrix-naber* (identifié par la suite au *B. subtilis*) et de *B. mesentericus*. La substance active de Tyrothrix est formée au quatrième ou cinquième jour de culture; sa production dépend étroitement du voile de culture qui doit rester en surface. La substance thermolabile (détruite à 70°), agit sur les bactéries intestinale in vitro et in vivo.

— SCHILLER (1925) (84), dont nous avons déjà signalé les beaux travaux sur les « antagonistes provoqués », transforme les bactéries protéolytiques *B. mesentericus fuscus*, *B. subtilis*, *B. anthracis* et quelques autres (sarcines, staphylocoque...) qu'il rend actif vis-à-vis de streptocoques pathogènes, du *B. bulgare*, du *B. acidophile* de MORO et du streptocoque lactique.

— MUCH et ses collaborateurs (1925) (55) isolent des souches fortement actives de *B. mycoïdes*, souches qui semblent assez rares dans la nature; les souches isolées ne sont d'ailleurs pas toutes également actives. KIMMERSTIEL (1923) (42) avait déjà signalé l'action lytique exercée par certaines souches de *B. mycoïdes* sur *mycobacterium tuberculosis*.

Par la suite, MUCH et SARTORIUS (1925) précisent une notion déjà notée par ROSENTHAL à propos de *B. mesentericus* et de *Tyrothrix scaber*; les souches actives de *B. mycoïdes* sont celles qui poussent en voile sur les milieux de culture liquide. Les souches qui ne poussent pas ainsi ne se révèlent pas antagonistes.

FRANCK et ISMET isolent aussi des souches de *B. mycoïdes cyto-lyticus*, qui sont capables de lyser de nombreuses bactéries pathogènes et non pathogènes. Le filtrat de culture est doué d'une activité identique (1926).

— Nous avons déjà cité les travaux de PRINGSHEIM sur *B. mesentericus*. WELAND (1936) considère l'action des filtrats de

B. mesentericus comme hautement spécifique vis-à-vis des bacilles diphtériques. HETTCHÉ et WEBER (1939) isolent quarante-et-une souches de *B. mesentericus* : ils se montrent antagonistes à l'égard du bacille diphtérique dans les vingt-quatre heures; de celles-ci, onze perdent leurs propriétés après deux repiquages.

— DUBOS (1939) isole du sol une bactérie aérobie sporogène, identifiée par la suite au *B. Brevis*, et qui possède un pouvoir lytique marqué à l'égard des bactéries Gram négatives. Il en isole par la suite la tyrothricine fractionnée enfin en deux substances d'activité inégale, la gramicine et la tyrocidine. Nous en reparlerons dans un chapitre ultérieur.

— ROSENTHAL (1927) étudie trente-et-une souches d'espèces différentes du groupe *subtilis mesentericus* et essaie leur activité antibactérienne contre des bactéries Gram négatives et des bactéries Gram positives; les bactéries Gram positives vivantes sont plus sensibles à l'action des aérobies sporogènes que les Gram négatives vivantes.

Au contraire, toutes les bactéries Gram négatives mortes sont sensibles à l'action des souches sporogènes, tandis que les bactéries Gram positives mortes ne sont pas touchées.

— JOHNSON B.-A. (40) isole d'une espèce du groupe *subtilis* une substance antibiotique, la bacitracine active in vitro contre les bactéries Gram positives contre le méningocoque et le gonocoque. In vivo cette substance est active dans les infections expérimentales dues au streptocoque hémolytique et aux germes de la gangrène gazeuse.

— En résumé, il semble définitivement établi (STOKES et WOODWARD, 1924) (92) que les souches de bacilles sporogènes possédant un pouvoir antagoniste marqué sont largement réparties dans le sol et possèdent des caractères morphologiques et biochimiques voisins, notamment la capacité de production H_2S et l'incapacité de faire fermenter l'amidon.

Rechercher et extraire la propriété antibiotique contenue dans ces germes, c'est simplement vouloir contrôler et mettre au service de la thérapeutique anti-infectieuse humaine et animale, une fonction que ces micro-organismes exercent normalement dans le sol.

TABLEAU II
ANTAGONISME DES BACTÉRIES AÉROBIES SPOROGÈNES

Antagonistes		Propriété	Références
B. Anthracis			FREUDENREICH (1888) SANFELICE, SIROTNIN
B. Brevis	Bactéries Gram Positif	Tyrothricin Tyrocidine — Grami- cidine	DUBOS 1930-1939.
B. Mesentericus	Nombreuses bactéries B. diphtérique	Bactériolytique Bactéricide	HETTCHS (1939) ANERSWALD - WEILAND
B. Mesent. vulgatus	C. diphteriae	Substance thermolabile non filtrable	PRINGSHEIM (1920)
B. Mycoïdes	7 à 20 espèces bactériennes	Lytique	BITTER (1941), MUCH (1924-1925)
B. Mycoïdes	M. tuberculosis	Substance thermostable précipitée par acid	KIMELSTIEL (1923-24)
B. Mycoïdes cytolyticus	la plupart des bactéries pathogènes		FRANKE et ISMET (1926)
B. subtilis	Bactéries variées M. tuberculosis B. typhose	Bactériolytique Subtilin	BITTER (1941); NICOLLE (1907), VAN CANNEYT (1926)
B. subtilis	M. tuberculosis et Gram positif		JANSEN et HIRSCHMANN (1944), SALLE (1945)
B. subtilis	Anaérobies	Subtilysine	VALLÉE (1945)
B. subtilis	Staphylo. Str. Eberth Toxines microbiennes et quelques bactéries	Subtiline	RAMON (1945)
B. subtilis	para. Colith. M. tuberculosis	Endo-subtilysine	OLIVIER DE ST. RAT, BONET MAURY- BLANCHON (1945)
B. subtilis et B. Mesentericus	Streptocoque nombreuses bactéries	Antagonisme provoqué	SCHILLER (1925)

CHAPITRE III

RECHERCHES SUR LE MODE D'ACTION DU BACILLE SUBTILIS ET DE L'EXTRAIT MICROBIEN

Ces recherches ont été entreprises à la suite des résultats obtenus en clinique en administrant per os des cultures de *B. subtilis* dans les affections intestinales : c'est en voulant contrôler les hypothèses (action substitutive et pouvoir amylolytique) qui ont servi de base à cette application thérapeutique, que les auteurs ont été amenés à constater que ce germe était doué d'une activité anti-microbienne puissante; cette propriété antibiotique a alors été étudiée in vitro et in vivo, à l'égard de différents germes pathogènes. D'autre part, l'extraction et l'isolement de principe actif contenu dans les corps microbiens ont été poursuivis parallèlement. Nous exposerons dans ce chapitre les recherches faites tant in vitro que in vivo pour élucider le mode d'action de *Bacillus subtilis*, et de l'extrait microbien.

Nous réserverons cependant un chapitre spécial pour exposer les conditions d'action de *Bacillus subtilis* à l'égard du bacille tuberculeux et pour décrire la technique d'extraction utilisée.

1) — *Action de Bacillus subtilis in vitro.*

Les auteurs escomptaient chez un enfant atteint de diarrhée verte avec fièvre une action de substitution; ils ont suivi pen-

dant le traitement l'évolution de la flore intestinale, par culture des selles; en fait, voici ce qui a été observé :

Une trace de matière estensemencée par épuisements successifs dans six tubes de bouillon nutritif. Dès le deuxième jour après le début du traitement, le bacille subtil apparaît dans les selles et chaque tube dans lequel apparaît le voile de subtilis s'éclaircit bientôt par lyse des autres germes qui s'y sont d'abord développés.

D'autre part, sur des malades atteints de colibacillose urinaire, et traités par injection intra-vésicale de culture de subtilis, nous constatons que quarante-huit heures après la première injection, les urines, prélevées par sondage contiennent du bacille subtil et du colibacille; six jours après la deuxième injection (faite quarante-huit heures après la première), il ne pousse plus que du bacille subtil et six jours plus tard les urines sont stériles.

Dans ce dernier cas, il s'ajoute donc à l'action substitutive du bacille subtil un pouvoir bactériolytique que nous avons étudié en ne faisant varier qu'un ou deux facteurs à la fois

Des tubes de 10 cc. de bouillon nutritif ont été ensemencés avec des doses croissantes de coli-bacille : 10^8 , 10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 germes, puis avec du bacille subtil à doses également croissantes : 10^8 , 10^9 , 2×10^9 , 5×10^9 . Le bacille subtil était ensemencé, tantôt vingt-quatre heures avant le coli, tantôt simultanément, tantôt vingt-quatre heures après. Dans tous les cas, les résultats ont été identiques. Le colibacille pousse pendant vingt-quatre heures avec une intensité égale au témoin. Le deuxième jour, vingt-quatre heures après l'apparition du voile formé par le développement du bacille subtil, débute la lyse qui s'accroît progressivement pour devenir totale au huitième jour.

Une souche de bacille subtil, entraînée par contacts successifs avec le colibacille, se développe vingt-quatre heures plus tôt et lyse les colibacilles plus rapidement.

Les mêmes expériences ont été réalisées sur le B. d'Eberth (souche personnelle), les paratyphiques A et B, (id.), La lyse progressive de ces germes a été obtenue également; elle débute vingt-quatre heures après le développement du voile de subtilis

en clarifiant le milieu d'abord au contact même du voile et gagne tout le tube de culture de proche en proche.

Sur le staphylocoque (souche de Londres), sur le streptocoque (souche Pasteur) et sur le pneumocoque, le *B. subtilis* a une action lytique plus rapide, totale en soixante-douze heures.

Le *B. subtilis* agit donc sur un grand nombre de germes pathogènes et les lyse d'une façon complète mais en des temps variables.

2) — Action de l'endo-subtilysine in vitro.

Après extraction, concentration et purification par des solvants organiques acides, la substance active est reprise par de l'eau alcaline et on obtient finalement une solution dont un centimètre cube correspond à un gramme de corps microbiens pesés secs. Les détails de cette méthode d'extraction feront l'objet d'un chapitre spécial.

La mesure de l'activité de cet extrait est faite par la méthode des dilutions; cet extrait se trouve en effet actif à l'égard des mêmes germes que le bacille subtilis lui-même. Pour chaque extrait, on ensemence quatre tubes de bouillon nutritif avec cent sept staphylocoques (souche Londres), puis on ajoute dans les trois premiers tubes des doses croissantes d'extrait, le quatrième tube sert de témoin. La bactériostase est obtenue à partir d'une dilution de l'extrait au 1 : 200, correspondant à deux milligrammes de corps microbiens, au centimètre cube. Le contrôle de la bactériostase a été d'autre part réalisé selon la méthode de HEATLEY des disques de papier : des disques de 5 mm. de diamètre sont imbibés du liquide à étudier et sont placés sur une boîte de gélose nutritive, préalablement ensemencée par contact direct avec un centimètre cube d'une culture de staphylocoque de quarante-huit heures et pipetage de l'excédent. Au bout de vingt-quatre heures d'étuve, autour du disque et sur un cercle de 2 cm. de diamètre, il ne pousse que de rares colonies, tandis que sur le reste de la gélose on obtient une culture en nappe. La substance active semble mal diffuser dans la

gélose, ce qui laisse prévoir qu'elle a un poids moléculaire élevé; un centimètre cube d'extrait ajouté à une culture de staphylocoque de vingt-quatre heures lyse cette dernière en vingt-quatre heures.

Les auteurs ont été amenés ainsi à définir une unité d'activité qui est la dose minima capable d'arrêter pendant dix-huit heures la prolifération de cent sept staphylocoques dans un tube de bouillon nutritif de 10 cc. Il faut alors 1 : 4 d'unité pour le streptocoque, trois unités pour le bacille d'Eberth et dix unités pour le colibacille pour exercer sur ces germes une action bactériostatique. Pour des doses plus fortes, c'est le facteur bactéricide qui entre en jeu. L'extrait actif, l'endo-subtilysine est également bactériolytique et lyse une culture de 10^9 germes avec deux unités pour le streptocoque, trois unités pour le staphylocoque, etc...

Nous avons ensuite fait agir in vitro sur l'endo-subtilysine certains facteurs, comme la présence de sang, qui se retrouvent in vivo et qui auraient pu diminuer l'activité de la substance. Après dosage d'un extrait avec la méthode précédemment décrite, nous avons recommencé l'expérience en ajoutant au bouillonensemencé 0,1 cc. de sang défibriné, puis l'extrait en proportions croissantes; on prépare de même un témoin (staphylocoque + sang) et enfin trois tubes (staphylocoque + extrait). Le résultat montre que le sang humain apporte un retard à la culture du staphylocoque témoin, qu'il semblerait favoriser l'action de l'endo-subtilysine; mais on doit d'abord penser qu'il y a plutôt addition des deux effets inhibiteurs : celui du sang et celui de l'extrait.

	T sang	T staph.	Sta + sang	Sta + extrait : cc.			Sta + extrait : cc. + sang		
				0,05	0,01	0,5	0,05	0,01	0,5
24 h.	—	++	—	—	—	—	—	—	—
36 h.	—	++	+	++	++	±	++	±	—
56 h.	—	++	++	++	++	++	++	++	++

3) — *Action de Bacillus subtilis in vivo.*

Avant d'expérimenter in vivo l'action de *B. subtilis*, nous nous sommes assuré de l'innocuité de ce germe, comme l'avaient déjà fait d'ailleurs de nombreux auteurs et NICOLLE en particulier (56). Son administration per os même à dose massive n'est suivie d'aucune réaction, chez l'homme et chez l'animal. De même l'injection intra-veineuse de $8,10^6$ bacilles au lapin n'est pas suivie de réaction néfaste.

Après avoir constaté in vitro l'action du *B. subtilis* sur le bacille typhique, cette action a été étudiée à l'égard du *typhimurium* sur des souris; on fait ingérer à un lot de souris du virus Pasteur, et en même temps du bacille subtil en poudre qui est mélangé quotidiennement à leur nourriture; un lot de souris témoins auquel on a administré aussi du virus Pasteur, ne reçoit pas de bacille subtil. On fait alors la courbe de mortalité des souris en fonction du temps (exprimé en jours). Tandis que la courbe des souris témoins atteint 90 % de mortalité en l'espace de six jours, la courbe du lot des souris traitées s'étale sur un temps beaucoup plus long et la mortalité n'est encore que 70 % après quinze jours. Au total, des trente témoins non traités, il ne reste qu'une survivante; sur les trente animaux traités, dix résistent à l'infection.

CHAPITRE IV

ISOLEMENT DE L'ENDO-SUBTILYSINE

L'isolement du principe actif d'un organisme possédant des propriétés antibiotiques pose le problème de la localisation de ce principe : la substance active est-elle dans le filtrat de culture ou dans les corps microbiens ? L'étude de la toxicité des microbes avait de même conduit au problème de la localisation des toxines : la toxine est-elle dans le milieu circulant ou restet-elle dans les corps microbiens. L'intérêt pratique de cette recherche se trouve pour le premier cas dans l'obtention du principe actif à partir de sa source en lui évitant des dégradations et pour l'autre cas, dans la possibilité d'attaquer la toxine localement ou de l'isoler à des fins vaccinales.

Mais ce problème qui demande une solution pour la médecine de tous les jours est long à résoudre ; les problèmes de chimie et de physiologie microbiennes qu'il pose ne sont pas de ceux que l'on peut résoudre rapidement. Aussi les diverses solutions envisagées varient-elles avec les conditions expérimentales proposées par chaque auteur. C'est ce qui explique que la plupart d'entre ceux-ci (NICOLLE (56), RAMON (72), VALLÉE (94), JANSEN (39), JOHNSON (40), qui se sont attachés à l'isolement du principe actif du Bacille subtil se sont adressés aux filtrats de culture, là où le principe avait été mis le plus facilement en évidence et d'où il pouvait être extrait le plus aisément.

OLIVIER et ses collaborateurs, par contre, isolent la substance active à partir des corps microbiens. Ces auteurs sont partis de données empiriques :

Un premier essai de concentration fait à partir du milieu de culture avait en effet échoué. Successivement, la stérilisation du milieu de culture par centrifugation, l'extraction par précipitation à l'acétone et au sulfate d'ammonium à saturation, la purification de ces extraits par solubilisation dans l'alcool butylique ou l'éther de pétrole, n'avaient pas abouti. Il en a été de même pour le précipité protidique du milieu de culture, repris par de la soude N/20.

D'autre part, un culot de corps microbien de *B. subtilis* non lavé, humide, correspondant à un poids sec de 1,350 gr. après broyage, en présence d'éther avec 30 cc. de sérum physiologique, donne un liquide actif, à la dose minima de 1/2 cc.

Devant la faible activité des extraits et surtout des filtrats, les auteurs pensent par analogie avec l'insuline que la substance active est détruite ou annihilée par le puissant équipement enzymatique du *B. subtilis*. Aussi, après lyse en milieu hypertonique sucré, les auteurs procèdent-ils à l'inactivation des ferments. Par extraction à l'éther, ils obtiennent un liquide actif à la dose de 1/20 de centimètre cube (à partir de 0,900 gr. de corps microbiens pesés secs pour 10 cc, d'émulsion de staphylocoque).

Ces expériences préliminaires réalisées, les auteurs s'attachent alors à la purification que nous allons décrire :

Les cultures de *B. subtilis* sont récoltées à la 35^e heure après le début de leur croissance, avant tout début de lyse; elles sont lavées à l'eau et centrifugées, puis broyées soigneusement avec leur poids de sable. Le broyage et l'agitation sont poursuivis pendant 3 heures en présence de cinq fois leur poids d'alcool à 95° à p. H 3.

L'extrait alcoolique est fortement coloré en brun jaune; on en sépare les cellules bactériennes et le sable par centrifugation ou filtration au Buchner. L'extraction de l'endo-subtilysine de sa solution alcoolique s'effectue commodément par la méthode de partage : à 100 cc. de solution alcoolique on ajoute 40 cc. de chloroforme, puis 60 cc. d'eau salée à 1/2 saturation. Dans ces conditions, le chloroforme se sépare en entraînant en solution l'endo-subtilysine et certaines impuretés notamment de la matière colorante. L'endo-subtilysine est purifiée par extrac-

tion à la soude N/10. Après 5 à 6 extractions, la totalité du principe actif passe en solution à l'état de sel de sodium. La solution finale a généralement un pH compris entre 5 et 6.

Cette solution encore fortement colorée, est purifiée et concentrée par une seconde extraction chloroformique à pH 3. Les liqueurs chloroformiques qui sont déjà moins colorées sont additionnées de trois fois leur volume d'éther ou pétrole léger. Cette addition provoque la séparation de quelques centimètres cubes de solution aqueuse fortement colorée, faiblement acide et riche en endo-subtilysine. Après séparation de cette première fraction, le mélange éthero-pétrolique est soumis à des extractions successives avec des quantités limites de solution de soude N/10, de manière que le volume final de solution alcaline d'endosubtilysine corresponde au 1 : 10 du poids des corps microbiens traités. La solution alcaline concentrée est ramenée à pH 7.

L'extraction a été réalisée de façon identique à partir des spores de *B. subtilis*, des formes libres poussant en profondeur du voile en voie de lyse et du voile muqueux jeune avant tout début de lyse. L'activité des extraits, déterminée par la méthode des dilutions sur une culture de staphylocoque (concentration 107) a montré que la teneur en endo-subtilysine est surtout élevée dans les cultures jeunes; dès que la lyse commence, la substance active disparaît des corps microbiens. Les spores et les formes libres n'en contiennent pas.

Ces extraits peuvent être utilisés pour des essais thérapeutiques expérimentaux; ils ne sont pas toxiques : en injection intra-veineuse chez le lapin, à la dose de 3 cc. ils ne provoquent aucune réaction; en injection intra-musculaire on n'observe aucune irritation locale.

Ils sont bien supportés chez les hommes en injections intra-veineuses, intra-musculaires et intra-rachidiennes.

Ces préparations sont suffisamment stables : elles gardent une activité constante. Conservées au froid, elles ne perdent que très lentement leurs propriétés.

Ces expériences nous permettent de comprendre l'intérêt particulier des milieux simples « synthétiques » et de l'import-

tance d'un début d'autolyse dans les essais d'extraction à partir des filtrats de culture.

JANSEN en Amérique, RAMON en France, préconisent l'emploi de milieux de culture « synthétiques » à base d'asparagine, ce qui élimine les causes de variation d'activité en rapport avec le milieu de culture, ce qui facilite l'extraction du produit actif sans être gêné par des substances étrangères.

— VALLÉE insiste sur la nécessité d'un début d'autolyse pour la libération des substances actives dans le filtrat : l'activité est déjà importante au cinquième jour. JANSEN extrait de même la subtiline à partir d'un filtrat de culture au quatrième jour : ce ne sont donc plus des cultures jeunes, non lysées.

Le mode d'extraction que nous préconisons n'est pas en contradiction avec les méthodes de RAMON, VALLÉE, JANSEN, qui extraient la substance active à partir du filtrat, d'une culture du quatrième jour (JANSEN) (39) ayant subi un début d'autolyse (VALLÉE) (94). Il s'agit ici d'extraire à partir des corps microbiens mêmes en culture jeune, et ressemblés en voile « le voile est le laboratoire où s'effectue l'élaboration de la substance active » (H.-R. OLIVIER). Dans ces conditions, la substance n'a pas encore diffusé dans la culture mais ne risque pas d'être dégradée par les ferments puissants du *B. subtilis*.

Par contre, les différents extraits ne se trouvent pas avoir les mêmes actions antimicrobiennes. La subtiline de JANSEN ne semble pas en particulier agir sur les bacilles ne prenant pas le Gram; les facteurs responsables de ces différences peuvent être très nombreux; nous ne citerons que les mieux connus à savoir : l'origine des souches de *B. subtilis*, la qualité nutritive des bouillons de culture utilisés par les différents auteurs et le mode d'extraction et de purification.

Chacun de ces points devra faire l'objet d'une étude particulière si l'on veut améliorer le rendement.

CHAPITRE V

ANTIBIOTIQUES ET MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

L'inhibition du bacille tuberculeux a fait l'objet de très nombreuses et patientes recherches depuis les premières données fournies par KOCH sur l'effet des sels d'or sur la tuberculose; les résultats thérapeutiques se sont montrés inconstants et incomplets. La résistance du bacille tuberculeux, qui en fait son principal caractère, nécessite pour sa destruction des agents chimiques actifs qui sont le plus souvent mal supportés par l'organisme. Les principaux efforts de la chimiothérapie ont porté sur la recherche de sels métalliques ou de groupements spécifiques dirigés contre le microbe, s'alliant avec une marge suffisante de tolérance de la part de l'organisme. Les récents progrès de la chimiothérapie permettent dans ce domaine de sérieux espoirs. Il n'est pas interdit de penser non plus que la recherche d'une immunité vaccinale n'aboutisse un jour à l'application d'une thérapeutique spécifique.

Cependant, devant les possibilités offertes par les découvertes récentes des antimicrobiens, il était raisonnable d'interroger le pouvoir de ces derniers à l'égard du bacille tuberculeux. C'est ce qu'ont fait quelques auteurs dont nous allons exposer ici les travaux.

Mais, étant donné les difficultés de la lyse de ce bacille, on doit, dans les expériences préliminaires, s'entourer des garanties nécessaires sur le degré d'inhibition du bacille tuberculeux et simplifier l'expérience de façon à ce qu'un contact direct soit

établi entre le bacille et la substance présumée active. Dans tous les cas ces expériences ne pourront être qu'une indication pour une application thérapeutique ultérieure de la tuberculose.

Il est donc nécessaire dans ces expériences :

- de définir la souche du bacille sur lequel les essais seront effectués et les conditions de ces essais,
- de séparer le pouvoir antimicrobien d'une sécrétion ou d'une substance *in vitro* et *in vivo*,
- de préciser si cela est possible le degré de modification subi par le bacille, c'est-à-dire l'étendue du pouvoir antagoniste de la substance.

Nous préciserons successivement ces trois points :



1^o) — En ce qui concerne les souches de bacilles tuberculeux utilisées au cours de l'expérimentation, le choix est en partie guidé par la nécessité de simplifier l'expérience pour en rendre la répétition et la lecture faciles : les cultures de bacilles en surface ne donnent pas à ce sujet toute satisfaction car la substance ne peut y être mise largement au contact des bacilles; le choix des expérimentateurs se porte sur des cultures homogènes, où les bacilles en suspension dans une culture liquide peuvent être atteints rapidement par simple diffusion et où la lecture de la lyse sera facilement appréciée. Ces cultures permettent de plus « d'ensemencer un nombre fixe et mesuré de bacilles.

— C'est ainsi que VAUDREMER (1913) (96) emploie des bacilles humains qui, après culture à 39° sur bouillon glyciné pendant un mois et après filtration, sont triturés et agités avec l'extrait à expérimenter; cette agitation faite quotidiennement permet d'obtenir une suspension homogène en quelques jours, suspension qui se stabilise au fur et à mesure que se prolonge la macération.

— VAN CANNEYT (1926) (95) fait usage d'émulsion de bacilles tuberculeux humains (souche RATTI) dont il ne précise pas le mode de préparation. Il vérifie d'autre part l'action des orga-

nismes antagonistes en ensemençant ceux-ci sur des colonies tuberculeuses de pommes de terre et sur des cultures en voile du même bacille : dans ce dernier cas, l'antagonisme ne se manifeste pas.

— ASHESOW (1945) (4) fait agir la substance active sur une émulsion de B. C. G.; mais il observe certaines irrégularités au cours de l'expérience, mises sur le compte du manque d'homogénéité de sa suspension.

— SOLTHYS (1945) (90) utilise le *Mycobacterium phlei*, culture jeune inoculée directement dans le milieu actif de diverses dilutions.

— OLIVIER et de SAINT RAT (1945) (61) emploient la souche homogène d'ARLOING et COURMONT (1897) :

Les bacilles tuberculeux peuvent pousser quand ils sont ensemencés dans un bouillon nutritif et non en surface, comme cela se pratiquait : dans ces conditions, les bacilles troublent les bouillons et ne s'agglutinent pas si on prend le soin d'agiter les cultures régulièrement; les bacilles de la culture se transforment peu à peu : des granulés apparaissent sur les filaments de cette culture qui leur servent de support; par agitation ces granulés sont libérés et ce sont eux qui vont donner naissance aux germes atypiques qui constituent la souche ARLOING et COURMONT. Ce dernier note, un demi-siècle après la mise au point de la souche homogène, qu'elle constitue un des meilleurs procédés pour étudier l'action antibiotique sur le bacille tuberculeux, des substances que l'on présume pouvoir être efficaces contre la tuberculose; il s'agit de cultures spéciales de bacilles authentiques d'origine humaine, bovine ou aviaire.

2°) — *Résultats des expériences de lyse in vitro, réalisées au moyen d'antibiotiques naturels.*

Les organismes actuellement connus pour leurs propriétés antagonistes à l'égard du bacille tuberculeux sont principalement *Aspergillus fumigatus*, *Bacillus subtilis*, *Actinomyces griseus* et quelques autres dont l'action semble plus faible; nous n'oublierons pas de rappeler le travail de SCHILLER (1925) (85) sur l'antagonisme provoqué des levures à l'égard du bacille tuberculeux.

Aspergillus fumigatus. — Les expériences de VAUDREMER (96) sur l'*Aspergillus fumigatus* sont les premières en date (1912). Nous avons déjà signalé cette étude dans un chapitre précédent; les observations de VAUDREMER sont les suivantes :

Expérimentation in vitro.

Une macération d'*Aspergillus fumigatus* est obtenue en joignant au liquide d'une culture de cette moisissure, sur milieu de Raulin pendant un mois, le suc extrait du mycelium par broyage. D'autre part, VAUDREMER obtient une émulsion de bacilles tuberculeux humains (1913) en les cultivant sur bouillon glycérimé à 39° pendant un mois, le filtrant sur papier, le triturant : aux bacilles ainsi préparés (10 grammes de filtrat) il ajoute 500 cc. de la macération précédente; il laisse macérer ainsi les bacilles pendant vingt-quatre jours à 39° en agitant quotidiennement, ce qui permet d'obtenir une émulsion stable.

Les bacilles sont alors examinés au microscope après coloration au Ziehl et au bleu de méthylène : il observe alors que la plupart des bacilles ont perdu leur acido-résistance et se colorent en bleu; quelques-uns cependant colorés en rouge sont granuleux et déformés : retenons au passage ces deux caractères, ils se retrouveront dans toutes les expériences de lyse.

Expérimentation in vivo.

1) — L'inoculation des bacilles ainsi préparés au cobaye en injection sous-cutanée et intrapéritonéale et au lapin en injection intrarachidienne n'est pas suivie de l'apparition de lésions tuberculeuses; le bacille tuberculeux n'est plus pathogène.

2) — Ces essais sur animaux sont suivis d'essais thérapeutiques sur la tuberculose humaine;

Traitement par des cultures filtrées d'*Aspergillus fumigatus*;

Traitement par des émulsions bacillaires. Les résultats sont encourageants (mais ne peuvent être poursuivis).

De ce travail fondamental vont naître les essais d'extraction de la substance active de l'*Aspergillus fumigatus*; les substances isolées par WAKSMAN, HORNING, SPENCER (Amérique, 1942) : la fumigatine; par CHAIN, FLOREY, JENNINGS et WIL-

LIAMS à Oxford, 1943 (11) ; l'acide helvolique, par POSTERNAK (Genève, 1943) (68) qui réalise une synthèse de la fumigatine (pigment brun d'*Aspergillus fumigatus*) ne sont pas signalées pour leur activité contre le bacille tuberculeux.

— SOLTHYS (Un. de Cambridge, 1944) (90) essaie d'isoler la substance active à partir du filtrat d'une culture d'*Aspergillus* sur un milieu de CZAPECK-DOX : l'activité du filtrat est attribuée à l'Aspergilline non isolée.

Le pouvoir antibactérien de la culture atteint son maximum vers le quinzième ou le vingtième jour : il est déterminé en faisant des dilutions du filtrat actif au bouillon frais (glycérine 5 %). On inocule ensuite une petite quantité (1 ou 2 mg.) d'une culture jeune de bacille sur bouillon glycérolé. Ces cultures sont inoculées à 37°. Le degré de développement dans les diverses dilutions d'*Aspergillus* est comparé avec celui des cultures de contrôle. Le test le plus communément utilisé est fait avec *Mycobacterium phlei* qui est inhibé dans des milieux contenant 1 à 2 % d'Aspergilline (filtrat). Les bacilles humains, bovins et aviaires sont inhibés dans un milieu à 5 ou 10 % de filtrat. A ces concentrations, l'Aspergilline se limite à une activité bactériostatique. L'auteur ne signale pas d'essais in vivo.

ASHESHOW et STRELITZ (Canada, 1945) (4), obtiennent à partir de la même moisissure cultivée sur milieu de CZAPECK-DOX (contenant 2 % de sirop de grains) une substance active contre les bactéries Gram positifs, Gram négatifs et les bacilles acidorésistants ; l'activité serait due à la présence de deux substances différentes, séparables par solubilité élective dans les solvants organiques.

— Le test d'activité bactériostatique adopté pour le bacille tuberculeux est le suivant : la substance diluée plus ou moins en un milieu de KIRCHNER, est inoculée avec une suspension de B. C. G. Les lectures sont faites entre dix jours et six semaines.

— L'action bactéricide est évaluée en inoculant une suspension lourde de B. C. G. dans des dilutions différentes de la substance active ; on laisse ensuite macérer vingt-quatre heures avant d'ensemencer des milieux de PETRAGNANI avec 0,1 de la mixture. La lecture des résultats se fait après six semaines.

RÉSULTAT :

L'action bactéricide à l'égard du B. C. G. est égale ou légèrement inférieure à l'activité de la substance vis-à-vis du staphylocoque : une émulsion de B. C. G. traitée avec une dilution au 1 : 500.000 de la substance active peut ne pas donner de développement sur le milieu de PETRAGNANI : des colonies isolées peuvent apparaître çà et là à des dilutions moins grandes : ces irrégularités sont attribuées à une émulsion imparfaite du B. C. G. provoquant des masses qui protègent les cellules bactériennes contre l'action de l'antibiotique.

L'auteur n'observe pas d'action bactéricide sur le type aviaire, même à des dilutions de l'ordre de 1 : 100. Les expériences sur animaux commencées dans le but d'étudier la toxicité et l'activité sont ajournées jusqu'à plus grande purification.

Seules des expériences sur des animaux infectés pourront certifier l'intérêt thérapeutique de ces substances.

Il est permis cependant, après les expériences de VAUDREMER, d'espérer un avenir fertile dans ce domaine.

Bacillus subtilis. — Les propriétés antagonistes du bacille subtil à l'égard du bacille tuberculeux sont connues depuis les expériences de VAN CANNEYT (1926) (95) ; elles ont été redécouvertes par un Brésilien : MAGARAO (1944) (51) sur les travaux de qui nous n'avons pu avoir de précisions, par OLIVIER en France (1945) (61) et SALLE en Californie (1945) (79). Et ce n'est point le moindre argument en faveur de la réalité de ce pouvoir que cette simultanéité.

Les expériences de VAN CANNEYT (95) font le pendant de celles de VANDREMER pour l'*Aspergillus fumigatus*.

In vitro :

1) — Cet auteur décrit l'action du *B. subtilis* sur les colonies tuberculeuses de pommes de terre ; le bacille se développe de préférence sur les colonies qu'il désagrège, mais n'exerce par contre aucune action sur les cultures en voile.

2) — Dans une dernière série d'expériences, il essaie d'isoler

le bacille tuberculeux à partir d'émulsions de bacilles humains ayant subi vingt-cinq jours le contact d'un bouillon épuisé par le bacille subtil et filtré, afin de se rendre compte du degré de modification subi par le germe pathogène. Dans ces conditions, il n'obtient pas de cultures pour des macérations supérieures à vingt jours. Les cultures obtenues après un contact inférieur à quinze jours sont par contre pleinement virulentes.

In vivo :

Des cobayes sont inoculés :

1) — Avec le liquide de la partie inférieure d'une culture de bacilles tuberculeux sur pommes de terre ayant subi l'action du bacille subtil pendant vingt-cinq jours.

2) — Ou bien avec des émulsions de bacilles tuberculeux humains ayant subi vingt-cinq jours le contact d'un bouillon épuisé par le bacille subtil et filtré.

Dans ces conditions, les animaux survivent huit à douze mois et plus dans la proportion de 80 %, alors que l'inoculation dans les mêmes proportions, d'émulsions non macérées, tuent en sept semaines.

Dans une expérience complémentaire, il inocule à des cobayes neufs des ganglions prélevés sur les cobayes traités dans les expériences précédentes. Ces cobayes survivent sans présenter de lésions tuberculeuses; ces ganglions présenteraient cependant quelques bacilles acido-résistants qui sont donc morts dans la plupart des cas.

— Ce n'est qu'aujourd'hui que ces observations ont pu trouver leur application pratique, nouvel exemple de cette période de stagnation que nous avons signalée à propos de la pénicilline et de l'*Aspergillus*.

— De l'observation de MAGARAO (51), nous ne connaissons que ces conclusions : une contamination accidentelle d'une culture de bacilles tuberculeux par un germe aérobie sporulé, Gram positif, permet à l'auteur d'étudier l'action lytique du bacille subtil à l'égard du *Mycobacterium tuberculosis* et d'une souche de bacille de la lèpre. Une subtiline brute, dont l'extraction n'est pas précisée, serait antagoniste du bacille tuberculeux in

vitro et in vivo. L'injection de cette substance au cobaye et au lapin à des doses thérapeutiques n'amènerait pas d'effet toxique.

— OLIVIER, DE SAINT RAT, BONNET-MAURY et BLANCHON (61 et 65) étudient systématiquement l'action du bacille subtilis sur divers Gram positifs et Gram négatifs, puis sur le bacille tuberculeux (souche homogène ARLOING et COURMONT). Cette souche donne un trouble sensible en milieu nutritif en six jours. Deux séries d'expériences sont faites par ces auteurs :

1) L'étude du pouvoir empêchant du bacille subtil : la substance capable d'inhiber la croissance bactérienne étant d'origine endogène, ne se libère que lorsque la lyse du bacille subtil commence et ne peut donc être mise en évidence sur les bactéries à croissance rapide; par contre on observe nettement son action sur le bacille tuberculeux qui se développe lentement (OLIVIER) (62). On ensemence donc en même temps le bacille tuberculeux et le bacille subtil et on constate que le milieu ne se trouble pas. Le bacille subtil exerce une action anti-microbienne sur le bacille tuberculeux.

2) — Etude du pouvoir bactériolytique.

On ensemence d'abord sur bouillon nutritif le bacille tuberculeux de la souche homogène, qui en six à huit jours provoque l'apparition d'un trouble nettement visible; on ensemence à ce moment le bacille subtil dont le voile se développe en surface après quarante-huit heures.

Une lyse commence huit jours après, à proximité du voile, et progresse de haut en bas gagnant progressivement tout le tube de culture du douzième au quatorzième jour. Si on centrifuge à ce moment, la culture pendant une heure à 4.000 tours-minute, on ne trouve pas trace de bacilles ni de granulations acido-alcoolorésistants.

La substance active extraite des corps microbiens a été essayée sur le bacille tuberculeux (souche ARLOING et COUR-

MONT) (B. K. H.) in vitro et dans la tuberculose expérimentale (bacille virulent) (65) avec une préparation d'endo-subtilysine titrant 30 unités environ au milligramme.

1) — Action in vitro.

a) — On ensemence des tubes de bouillon nutritif avec 1 : 2 d'une culture de B. K. H. de quatre jours et on ajoute aussitôt des doses progressives d'endo-subtilysine brute. On observe à partir des tubes qui contiennent quatre unités une bactériostase qui retarde la prolifération bactérienne; à partir de dix unités, un arrêt si prolongé qu'on peut considérer qu'il se manifeste alors une action bactéricide.

b) — Si à des cultures de six jours on ajoute des doses croissantes d'endo-subtilysine, on observe à la quarante-huitième heure un éclaircissement de la culture dû à la lyse du B. K. H. à partir d'une concentration de dix unités. Cette lyse n'est jamais totale, comme celle que l'on obtient avec le colibacille.

2) — Action dans la tuberculose expérimentale.

a) — Injectée sous la peau du cobaye, l'endo-subtilysine brute utilisée pour ce travail, provoque des nécroses qui s'opposent à un traitement prolongé; l'expérience n'a pu être prolongée qu'un mois et porte sur vingt animaux dont il ne reste à la suite d'une épidémie de chenil que trois animaux traités et deux témoins. L'injection a été faite avec du bacille humain (souche Caxo) à la dose de 1 : 200 mg. injecté sous la peau de la cuisse. Les animaux traités reçoivent 260 unités d'endo-subtilysine. Ils sont sacrifiés avec les témoins au vingt-huitième jour de l'injection. L'autopsie révèle sur les témoins la présence : sur l'un, de deux petits ganglions lombaires, d'un gros ganglion trachéo-bronchique et d'une splénomégalie modérée; sur l'autre, un petit ganglion lombaire; tandis que sur les traités, on ne trouve aucune lésion macroscopique.

b) — Six lapins sont injectés avec 1 : 10 mg. de bacilles bovins. Trois sont traités par des injections intra-veineuses et intra-musculaires d'endo-subtilysine sans incident; on injecte ainsi 1,245 unités. Les trois autres servent de témoins. La date d'apparition des lésions perceptibles à l'examen sont les suivantes :

Animaux témoins				Animaux traités		
Date	41	42	43	38	39	44
21 ^e jour ...	Nodule gros comme un pois	pois	pois	0	0	0
30 ^e jour ...	Nodule gros comme une noisette	olive	olive	0	0	0
43 ^e jour ...	Nodule gros comme une noix	2 fois gros comme un œuf de pigeon	Grosse masse allongée	4 petits grains de Pb	0	0
50 ^e jour ... arrêt du Trait	Grosse masse + 2 nodules noix	id.	Ganglion gros comme un œuf de pigeon	Ganglion gros comme un pois	0	0
		id.	(sacrifié)	(sacrifié)	0	0
70 ^e jour ...	En augmentation				2 petits grains de Ph	

TABLEAU I

L'expérience est donc concluante. Malgré l'insuffisance du traitement qu'il est possible de décupler, l'évolution de l'infection tuberculeuse est considérablement retardée dans ses manifestations extérieures.

— S. SALLE (septembre 1945) (79), étudiant l'action de la subtiline préparée selon la technique de HAUSEN et HIRSCHMANN (39) constate aussi son action sur le *mycobacterium tuberculosis*; il inocule celui-ci sur milieu de LONG et lui ajoute de la subtiline à des dilutions variant entre : 1 : 5.000 et 1 : 250.000. Il constate qu'aux fortes concentrations la subtiline est bactéricide et aux grandes dilutions, bactériostatique.

Les émulsions de bacilles humains macérés vingt-cinq jours dans le bouillon épuisé par le *B. subtilis* (VAN CANNEYT) (95), n'ont pas subi la bactériolyse puisque, injectés au cobaye, ils peuvent se retrouver dans leurs ganglions. D'autre part, ces bacilles ne sont plus aussi virulents; il s'agit donc d'un pouvoir bactériostatique et bactéricide, inhibant non seulement la croissance des bactéries, mais les tuant en partie.

L'expérience d'OLIVIER montre qu'à ce pouvoir bactériostatique et bactéricide s'ajoute un pouvoir bactériolytique. Le bacille subtil jouit sur le bacille tuberculeux (souche ARLOING et COURMONT) de propriétés bactériostatique et bactériolytique, l'endo-subtilysine, même à des doses insuffisantes, agit sur l'évolution des lésions en les retardant d'une façon notable.

PRINCIPALES SUBSTANCES ANTIBIOTIQUES

Substance	Organisme	Activité biologique
Actinomycétine	S. albus	Bactériolytique : quelques Gram positif.
Actinomycine	S. antibioticus	Gram pos. et à haute concentration Gram nég. tox.
Acide aspergillique . . .	A. Flairis	Gram pos. et Gram nég.
Chaetonine	Ch. cochliodes	Gram pos. inactivé in vivo
Clavacine	B. clavatus	Gram nég., Gram pos. bactéricide toxique
Flavicine.	A. flavus	Semblable à la pénicilline
Fumigacine (ac. helvolique)	A. fumigatus	Gram pos. légèrement tox.
Fumigatine	A. fumigatus	Activité limitée
Gliotoxine	Trichoderma	Moisissures et bactéries variées. Toxique.
	A. fumigatus	
Gramicidine	B. Brevis	Bactériolytique : Gram pos. hémolytique - active in vivo
Notatine (penatine, coryliphilline)	P. Notatum	Agit en présence du glucose Gram pos. et Gram nég.
Penicidine	Penicillium sp.	E. typhosa
Acide pénicillique	P. puberulum	Gram pos. et Gram nég.
Penicilline	P. notatum	Gram pos. aérobies et anaérobies. Active in vivo — peu toxique.
	P. chrysogenum	
Proactinomycine	A. gardueri	Gram pos. toxique
Pyocyanase	Ps. aeruginosa	Bactériolytique : quelques Gram pos. et Gram nég.
Pyocyanine	Ps. aeruginosa	Gram pos. légèrement tox.
Spinulosine	P. spinulesum	Faible activité
	A. fumigatus	
Streptomycine	S. griseus	Gram nég. Gram pos. Active in vivo — peu toxique
Streptothrycine.	S. lavenduli	Active in vivo — légèrement toxique
Subtiline	B. subtilis	Gram pos. Mycob. tuberculosis.
Endosubtilysine	B. subtilis	Bactériolytique : certains Gram pos. et Gram nég. mycobact. tuberculosis souche Arloing et Courmont non toxique — active in vivo.
Subtilysine.	B. subtilis	Anaérobies
Tyrocidine	B. brevis	Bactériolytique
Tyrothricine	B. brevis	Gram pos. toxique
Violaceine	Ch. violaceum	Gram positif

Tableau emprunté à WALKSMAN (9)

CHAPITRE VI

APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES DES PRINCIPAUX ANTIBIOTIQUES CONNUS

Nous ne pouvons songer entreprendre une étude des antibiotiques actuellement connus; elle serait hors de proportion avec le cadre de cet exposé : nous rappellerons seulement les possibilités thérapeutiques offertes par les principales substances connues et utilisées à ce jour; nous joignons à ce résumé un tableau emprunté à un ouvrage récapitulatif de WAKSMANN (98).

La pénicilline (60) est principalement bactériostatique; active in vitro sur les cocci pyogènes, les clostridies anaérobies, certains cocci Gram négatifs, le tréponème; inactive sur le groupe coli-typhique. Elle a démontré son action curative dans les infections dues au streptocoque hémolytique, au pneumocoque, au méningocoque, au gonocoque sulfamido-résistant et dans les staphylococcies avec ou sans bactériémie, la syphilis, les infections à clostridies et certains ultra-virus. Sa toxicité vis-à-vis des cellules tissulaires, peu élevée, serait due aux cations utilisées dans la préparation des sels de pénicilline. Elle est inactive par voie digestive et requiert des doses totales de 500.000 à 1.000.000 d'unités Oxford par traitement en injections sous-cutanées, intra-musculaires ou intra-veineuses.

La corylophiline (49-50) extraite du milieu de culture du *Penicillium corylophilum*, malgré son pouvoir lytique in vitro sur le staphylocoque, le streptocoque, les tréponèmes et les trypanosomes, s'est montrée pratiquement inactive in vivo. Son

application locale dans les infections^{*} staphylococciques de de l'homme a par contre donné des résultats favorables.

La tyrothricine isolée des cultures du *Bacillus brevis* (DUBOS) (16, 17, 19), se montre bactéricide; elle a pu être fragmentée en deux principes, la tyrocidine bactéricide aussi et la gramicidine, fortement bactériostatique; la gramicidine est plus toxique que la tyrocidine, mais la dose toxique serait cependant inférieure à la dose nécessaire pour tuer les cocci Gram positifs; elle est aussi dix fois plus toxique que la pénicilline.

La gramicidine a donné des résultats favorables dans les mastites chroniques, les infections locales, telles que ostéomyélite, conjonctivite.

La tyrothricine a été essayée avec succès dans l'otite moyenne aiguë, les mastoïdites chroniques et les sinusites; elle présente des inconvénients : le staphylocoque prend rapidement en sa présence des variétés résistantes. Elle est inhibée par certains phospho-lipides et présente en injection une action hémolytique; elle est enfin peu active par voie digestive.

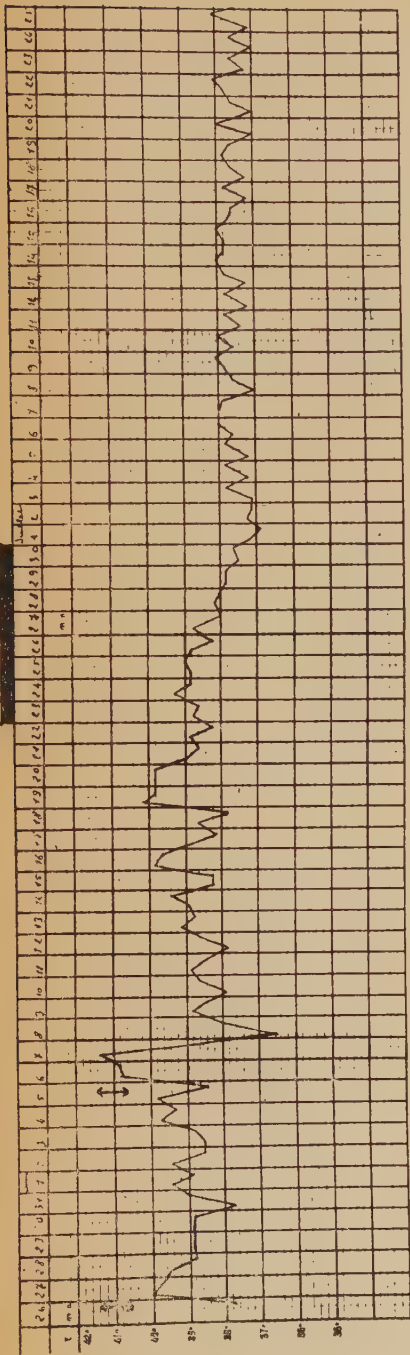
La gramicidine S. extraite des cultures d'un bacille analogue au précédent isolé du sol russe (G.-F. GAUSE et M.-G. BRAZHNIKOVA) (31) se montre active sur une plus grande échelle que la tyrothricine; la gramicidine S empêche le développement et tue plusieurs variétés de bactéries Gram négatives in vitro. Employée surtout en applications locales sur les plaies ou dans les cavités, elle s'est montrée efficace dans les suppurations des tissus mous, l'ostéomyélite, certaines péritonites et quelques infections cutanées. Elle ne semble pas avoir de toxicité.

La streptothricine (24) est active in vitro et in vivo sur les bactéries Gram négatif et Gram positif; sa toxicité est suffisamment faible pour permettre son injection dans les tissus infectés. Elle a été préconisée dans les infections des voies digestives : dysenterie bacillaire, fièvre typhoïde, salmonelloses.

La streptomycine (24) qui s'est révélée plus active in vitro que la streptothricine dans la tuberculose expérimentale, et peu toxique, a été essayée dans la fièvre typhoïde; en injection elle stérilise le sang et les voies urinaires, et en ingestion provoque la disparition des bacilles typhiques des fèces.

—

D. Subtilis: 24 mg + Ino Bill.



Thiazomides 9 gr.

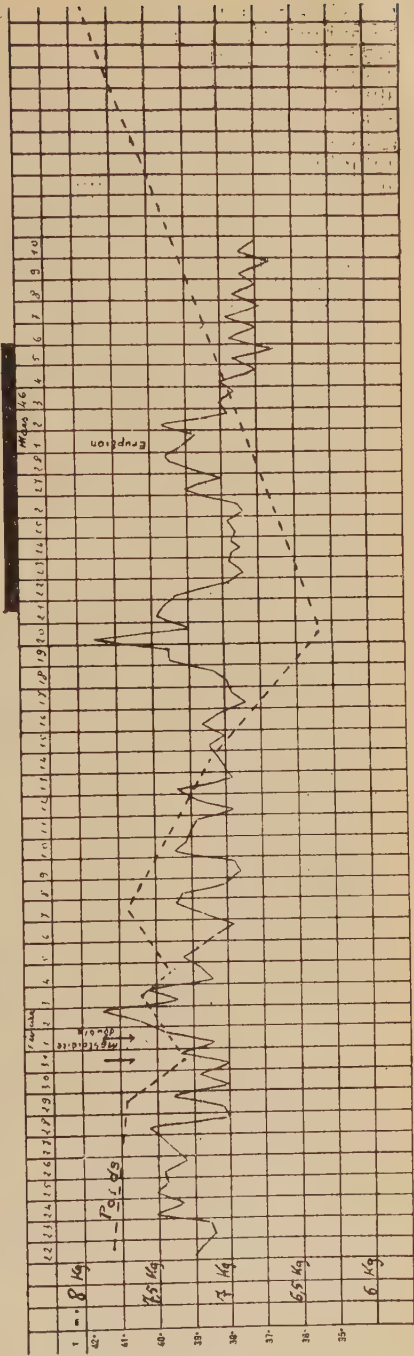
Thyroxides 3gr

Indromides 3
Pénicilline.

Thiazomides

Pénicilline : 320 000 u.

B Subr. 1, 5



CHAPITRE VII

APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES DE BACILLE SUBTILIS

1) — LES DIARRHEES.

Parmi les propriétés biologiques du bacille subtil, deux ont retenu notre attention, nous semblant particulièrement aptes à combattre les troubles intestinaux que, par analogie avec les ferments thérapeutiques, nous envisageons de traiter : son activité abiotique d'une part, son pouvoir amylolytique d'autre part; nous escomptions que :

- 1) — Les propriétés abiotiques de bacille subtil et de l'endo-subtilysine pourraient combattre efficacement les troubles intestinaux d'origine infectieuse ou toxico-infectieuse; le bacille subtil proliférerait dans l'intestin et se substituerait alors aux germes saprophytes.
 - 2) — L'équipement enzymatique du bacille subtil, très riche particulièrement en ferments amylolytiques, permettrait le rétablissement de l'équilibre intestinal rompu par une alimentation hydrocarbonée trop exclusive. Nous avons alors porté notre choix sur certaines variétés de diarrhées que nous classons à *posteriori* de la manière suivante :
- 1) — Diarrhées aiguës des nourrissons et diarrhées aiguës des toxi-infections d'origine alimentaire.

- 2) — Diarrhées chroniques : ces diarrhées forment un ensemble très varié d'où l'on a pu isoler successivement quelques types bien définis cliniquement, bactériologiquement ou chimiquement. Seules les diarrhées fonctionnelles nous ont retenu et parmi elles, celles si fréquentes aujourd'hui, les diarrhées de fermentation.

DIARRHEES AIGUES.

A. — DIARRHÉE DES NOURRISSONS.

On sait la difficulté d'établir l'étiologie des diarrhées des nourrissons; mais on sait aussi la facilité avec laquelle une alimentation mal réglée amène des troubles intestinaux d'origine toxique ou infectieuse, l'une se greffant fréquemment sur l'autre.

Nous apportons quatre cas, tous guéris en l'espace de deux à quatre jours par l'ingestion de cultures séchées de *B. subtilis*.

Les deux premiers cas ont été présentés dans une communication à la Société de Gastro-Entérologie (OLIVIER, BLANCHON, de SAINT RAT et BONET-MAURY) (59).

- 1) — D..., onze mois; est vu au deuxième jour d'une diarrhée, non fébrile, quatre à cinq selles par jour, liquides, franchement non digérées. On donne six comprimés par jour, correspondant à 3 mg. de bacilles pesés secs; au bout de quarante-huit heures les selles sont à nouveau normales.
- 2) — L..., quatorze mois, est malade depuis huit jours : huit à dix selles par jour, liquides, tantôt granuleuses, tantôt vertes. Traité sans succès par une préparation antidiarrhéique et des injections d'hordénol; on lui donne six comprimés (4 mg. de bacille) par jour. Dès le deuxième jour, les selles deviennent moins fréquentes, elles sont brunes, et au quatrième jour du traitement, elles redevennent normales, jaunes, bien liées, et on reprend une alimentation normale.

3) — A..., une semaine. Venue au monde prématurément (sept mois et demi) pèse à sa naissance 1.580 gr. et perd 250 gr. de son poids dans les six premiers jours; est mise au régime mixte, lait maternel et lait condensé léger au troisième jour. Elle présente de la fièvre à 39° le sixième jour en même temps qu'apparaît une diarrhée verte, six à huit selles par jour; lorsque le traitement est commencé le huitième jour elle à 40° de température. On lui administre alors six comprimés par jour : la température tombe dès le neuvième jour et les selles sont moins nombreuses et jaunes au dixième jour (deuxième jour du traitement); l'alimentation normale est reprise au quinzième jour, le poids est remonté à ce qu'il était à la naissance.

4) — B..., onze mois (observation H.-R. OLIVIER) est vu à sa sortie de l'hôpital, d'où il a été retiré dans un état désespéré sur la demande des parents; il est à la huitième semaine d'une coqueluche compliqué d'otite à la quatrième semaine et de mastoïdite bilatérale opérée à la cinquième semaine, elle-même suivie d'un état fébrile permanent avec clochers de température de 40° et plus. Un traitement aux thiazomides et des doses massives de pénicilline administrées au cours de cette huitième semaine n'ont amené aucune modification; l'enfant est alors très amaigri; la perte de poids (2 kg. sur 8 au début de la maladie) a été accentuée, surtout dans les derniers jours; il n'a plus la force de tousser, ses membres sont froids et cyanosés, le visage est violacé, la température est de 39°8; la constipation qui a accompagné la maladie a fait place à de la diarrhée; il a présenté dans la nuit précédant son examen, une vingtaine de selles liquides, peu abondantes; l'enfant ne s'alimente plus.

Le traitement mis en œuvre est le suivant : cultures humides de *B. subtilis* : une cuillerée à café toutes les heures (correspondante à 50 cg. de corps microbiens secs par jour); thiazomide (0,50 cg. par jour) et transfusions répétées.

Le lendemain, la température tombe graduellement : 39°4 le matin, 38°5 à midi, 37°8 le soir. Les selles moins nombreuses dès le second jour redeviennent normales, jaunes, un peu consistantes le troisième jour et la température reste à 37°2 et 37°8; en même temps l'enfant reprend un aspect plus normal et se réali-

mente. Le sixième jour après le début du traitement, il est pris d'un accès fébrile à 39°, qui monte à 39°6 le huitième jour; le neuvième jour apparaît sur les avant-bras et sur le visage une éruption érythémateuse, apparue brusquement, qui disparaît de la même manière le dixième jour. La température redescend : un peu de température à 37°8 tous les soirs. Revu vers le dix-huitième jour, l'enfant s'alimente bien, a repris des couleurs normales et a perdu en partie son aspect cachectique; les selles sont normales, il présente encore quelques quintes de toux. Revu quatre semaines après le début du traitement, l'enfant en bonne santé a repris son activité normale et dépasse 8 kg.

(Voir la reproduction de la courbe de température et du poids).

B. — DIARRHÉES D'ORIGINE ALIMENTAIRE.

- 5) — Nous rapportons (*Soc. de Gastro-Entérologie*, mêmes auteurs), l'histoire d'une famille de sept personnes dont cinq sont successivement atteintes de diarrhée à la suite d'ingestion de rillettes.

Quatre enfants sont guéris en quarante-huit heures après ingestion de 3 mg. de bacille subtil par jour, la mère est plus atteinte; elle présente un syndrome de recto-colite dysentérique avec ténesme, épreintes et émissions de glaires sanguinolentes. Les deux premiers jours elle prend 5 mg. de bacille subtil par jour, sans succès; elle prend alors, en dehors de nous, 10 puis 20 mg. par jour de bacille subtil. Au bout de quarante-huit heures, guérison. Les selles qui depuis les restrictions étaient toujours défaites et pâteuses, deviennent moulées et le sont restées depuis.

- 6) — M. M..., cinquante-cinq ans (H.-R. OLIVIER) est vu au quatrième jour d'une recto-colite dysentérique que le malade attribue à une ingestion d'huîtres, coliques douloureuses, surtout nocturnes avec fièvre; selles glaireuses et sanguinolentes, très fréquentes avec épreintes; le traitement au bismuth et à la bulgarine n'ont pas amené d'amélioration; seul l'élixir parégorique amène un soulagement des crises douloureuses.

Le malade est mis à la diète hydrique et au traitement par le bacille subtil, 5-6 gr. par jour en ingestion et petits lavements avec des cultures liquides de bacille; les coliques douloureuses

et les selles sanguinolentes cessent dès le lendemain; au quatrième jours, les selles sont redevenues normales.

- 7) — Mme L..., trente-quatre ans (H.-R. OLIVIER). Syndrome de recto-colite dysentérique avec selles muco-sanglantes, fièvre, épreintes et ténésme, traité le second jour après l'apparition. Le lendemain les coliques et les émissions sanglantes cessent complètement; les selles sont à peu près normales le deuxième jour du traitement qui a consisté en ingestion de bacille et en petits lavements avec des cultures liquides.
- 8) — Mlle V..., vingt-et-un ans (H.-R. OLIVIER). Vue au troisième jour d'une recto-colite survenue brusquement avec coliques violentes à prédominance nocturne; selles liquides quatre à cinq jours, au début devenues glaireuses, coïncide avec la période des règles. Les selles sont encore diarrhéiques le lendemain du traitement (ingestion 4,5 gr. par jour et petits lavements avec cultures liquides). La malade présente encore des coliques douloureuses très atténuées dans la nuit; le deuxième jour du traitement, elle ne présente plus qu'une selle par jour et les phénomènes douloureux ont complètement disparu.

*
**

LES DIARRHÉES CHRONIQUES.

Elles formaient anciennement un groupe confus où l'on démêlait à peine quelques causes infectieuses ou fonctionnelles. La rectoscopie, la radiographie et les examens coprologiques ont permis d'élucider l'origine du symptôme « diarrhée chronique » dans bien des cas; ils ont permis par la même occasion, une classification étiologique assez complète de ces diarrhées. C'est ainsi que les diarrhées lésionnelles (BENSAUDE) nées sous l'influence d'irritation de la paroi intestinale peuvent être dues à des germes comme le B. tuberculeux, à des parasites comme l'amibe dysentérique qui, lorsqu'elle ne s'installe pas sur la partie terminale de la muqueuse intestinale, procure le tableau clinique d'une diarrhée chronique.

L'examen chimique des selles est ici d'un intérêt particulier car il peut déceler la présence anormale de mucus d'hypersécrétion, de sang d'ulcération, d'albumine dissoute de transsudation.

Le diagnostic des diarrhées cancéreuses pourra être porté avec l'aide de la rectoscopie (cancer recto-sigmoïdien) et de la radiographie. La toxicologie moderne a enfin attiré l'attention sur le symptôme diarrhée chronique pour le dépistage ou la prévention de l'intoxication mercurielle par exemple.

Les diarrhées « fonctionnelles » par contre, ne bénéficient pas de moyens de diagnostic aussi précis : si les lésions pariétales peuvent être décelées et leur cause précisée, il n'en est pas de même des modifications chimiques et bactériologiques du contenu intestinal et encore moins de l'origine de ces désordres fonctionnels. Le tableau clinique cependant permet souvent ici de préciser l'origine des troubles intestinaux ; les diarrhées des gloutons qui ne mastiquent pas, des gastriques hyperchlorhydriques, des coliques de fermentation, des insuffisances hépatopancréatiques ; enfin les diarrhées des nerveux pourront être reconnues dans bien des cas par les caractères des selles associées à des signes cliniques qui parlent en faveur de tel ou tel organe ou appareil. D'autres diarrhées chroniques d'origine générale ou endocrinienne sont encore plus difficiles à préciser ; il en est enfin qui ne peuvent être rapportées à aucune cause connue.

Nous avons retenu parmi ces nombreux types les diarrhées de fermentation en raison de la puissance de ferment amylytique de *B. subtilis*.

COLITES FERMENTATIVES

Ces colites provoquées par une alimentation trop riche en féculents sont devenues particulièrement fréquentes depuis les restrictions.

— Ces dyspepsies fermentatives avaient été individualisées par MEYER et SCHMIDT qui les avaient isolées du groupe confus des colites chroniques.

— STRASSBURGER avait apporté dans l'étude de cette maladie le soutien de l'épreuve de la fermentation qui porte son nom. Elle consiste à mesurer dans des conditions déterminées la qualité de gaz dégagée. Cette épreuve, malgré son caractère approximatif, permet déjà à elle seule de débrouiller de nombreux cas douteux.

— GOIFFON et ROUX ont parfait cette étude par la mise au point d'une technique de dosage précise se basant sur une longue expérimentation. Cette méthode permet de doser les acides libres et combinés formés lors de la fermentation intestinale. La constatation par ces auteurs de la fixité remarquable du taux des acides, permet de considérer comme pathologique une variation de quelques unités de ce taux.

Les mêmes auteurs ont d'autre part établi que la cause immédiate des colites fermentatives réside dans le « dysmicrobisme intestinal », c'est-à-dire dans la prolifération d'une certaine catégorie de microbes dits « iodophiles » qui deviennent prépondérants surtout au niveau de la terminaison de l'iléon et au niveau du caecum; cette prolifération est elle-même soumise à un certain nombre de facteurs : alimentation trop riche en féculents, capacité variable de digérer les glucides pour un intestin donné, terrain (sensibilisation), hérédité.

Nous rapportons six cas qui se répartissent de la façon suivante : trois guérisons, une amélioration, deux échecs.

- 9) — Mme C..., trente-huit ans, dolicho-côlon de l'angle gauche chez une malade présentant de l'aérogastrie depuis dix ans. Se plaint surtout de crises de ralentissement cardiaque et de sensation d'étouffement survenant particulièrement après l'ingestion de féculents. Constipation, ballonnements, gaz.

Le traitement au bacille subtil entrepris à dose progressive de 5 à 10 cg. de corps microbiens par jour à partir du 13 octobre 1945 pendant deux mois; le régime rétabli rigoureusement après un mois de traitement amène seul une amélioration de ces crises. Le bacille subtilis n'a rien changé à son état. Le moindre écart de régime est suivi de malaises.

10) — M. R... se plaint surtout d'une sensation de plaie à vif sous-costal gauche et dans la fosse iliaque gauche, immédiatement ou vingt minutes après les repas et durant deux-trois heures. Présente un dolicho colon de l'angle gauche. A subi deux interventions chirurgicales, l'une en 1939 pour périoduodénite, et l'autre en 1943, gastrectomie pour ulcus de l'antré. Présente des périodes de constipation suivies de débâcles diarrhéiques, ballonnements et gaz — selles pâteuses, fermentant rapidement à l'air, acidité 20,2 (normale 15-16). Traité sans résultat appréciable au bacille subtil (10 cg.) de bacille par jour pendant deux mois; les selles sont seulement devenues un peu plus régulières à la suite de petits lavements quotidiens comprenant 1 gr. de poudre (5 cg. de bacille).

11) — M. R..., trente-huit ans. Présente depuis son retour de captivité des crises de diarrhées durant quelques jours, précédées de douleurs abdominales nocturnes surtout, amaigrissement léger — Selles : acidité : 28 — Ammoniaque : 1,3.

Le traitement par le bacille subtil amène une amélioration, après un mois et demi de traitement irrégulier : 5 cg. de bacilles par jour pendant deux périodes de quinze jours.

Les-selles sont normales. Ne présente plus de coliques.

12) — M. Th... présente depuis le mois de février 1945 des crises de coliques douloureuses s'accompagnant de diarrhées, alternant avec des périodes de constipation.

Ces phénomènes se sont surajoutés brusquement à une aéro-phagie permanente depuis dix ans.

Vu en période de diarrhée : selles aérées, abondantes, pâteuses, trois à quatre par jour, brun-jaunâtre — acidité : 26,4 — pH 6 — ammoniaque : 3,6. L'abdomen ballonné et tendu est sensible à la palpation des fosses iliaques qui sont gargouillantes, surtout à droite; traité à partir du 30 octobre 1945 par le bacille subtil à la dose de 5 cgr. par jour.

Amélioration sensible après un mois de traitement; les coliques sont espacées et de courte durée suivies rapidement d'une selle diarrhéique seulement.

Continue son traitement pendant un mois encore. L'amélioration se précise au point que le malade peut se permettre de gros écarts

pendant les fêtes de fin d'année sans présenter aucun trouble digestif; les selles sont normales pendant de longues périodes; parfois un peu de constipation rapidement suivie d'un épisode diarrhéique sans autres troubles fonctionnels.

13) — Mme G..., quarante ans (H.-R. OLIVIER). Présente à son retour d'un séjour à la campagne en septembre 1945 des diarrhées fréquentes survenant tous les huit ou dix jours à la suite d'une petite période de constipation. Se traite au bismuth en décembre sans résultats. Les crises de diarrhée devenant plus fréquentes, la malade demande un traitement. Traitée par le bacille subtil 5 cgr. par jour, elle arrête d'elle-même son traitement après une disparition complète de la diarrhée et de la gêne parfois douloureuse précédant ces crises, au bout de dix jours environ. Depuis l'arrêt de son traitement, les troubles digestifs n'ont jamais repris. Cette malade a cependant présenté des rechutes (non traitées).

14) — Mlle B..., vingt-et-un ans. Crises douloureuses très vives siégeant dans le côté droit de l'abdomen, s'accompagnant de constipation, nausées et perte de l'appétit. Pas de température. Présente ces signes depuis six mois.

Traitement : régime, culture de bacille subtil, suivi pendant deux mois. Amélioration progressive; les nausées disparaissent en premier. Elle ne présente maintenant plus de douleurs ni de constipation.

N'a plus souffert depuis et les selles sont toujours normales.

15) — G..., quatre ans. Traité depuis sept mois pour spasmodie et dyspepsie intestinale, présente un transit intestinal après ingestion d'aliments crus (fruits, légumes), cinq à dix selles par jour, peu abondantes, liquides, jaunes, mal digérées et fétides. Pas de fièvre (36°5). Seul le régime amène une légère amélioration. Traité par le bacille subtil (0,5 mg.) par jour pendant quarante jours, une amélioration nette est constatée dès le huitième jour : régularisation de la digestion : le transit redevient normal : selles bien moulées, une à deux par jour. L'enfant peut désormais s'alimenter sans inconvénients de fruits, crus et cuits. Cette amélioration se maintient après un an.

DISCUSSION

Dans les diarrhées aiguës, le succès est presque total; dans les quarante-huit heures qui suivent l'ingestion de culture de bacille subtil, la fièvre et la diarrhée disparaissent à peu près complètement; les coliques et les phénomènes d'irritation anorectale qui accompagnent les recto-colites dysentériques disparaissent au moins aussi rapidement.

Dans les diarrhées chroniques au contraire, les résultats thérapeutiques se sont souvent chiffrés par des échecs. Nous avons essayé d'en comprendre la raison.

L'hypothèse de départ impliquait la prolifération du bacille subtil dans le tube digestif. Pour nous rendre compte du bien-fondé de cette hypothèse, nous avons avec H.-R. OLIVIER réalisé l'expérience suivante : des cobayes sont bourrés de bacilles subtil qui sont ingérés, mélangés en grande quantité aux aliments; les animaux sont ensuite sacrifiés et des coupes sont faites. Nous n'avons pas observé (ce qui avait été signalé par certains auteurs) un feutrage de bacille subtil au niveau de la muqueuse ni aucune forme reconnaissable de bacille subtil (formes flagellées, formes en mycélium). Nous avons rapproché ce fait des observations classiques faites sur les ruminants où l'on ne trouvait que les seules spores; ceci explique que lorsqu'on a ensemencé des selles de nourrisson, le voile n'apparaît en culture que quelques jours après. Le bacille subtil ne peut donc subsister dans l'intestin; seuls persistent les spores dont les propriétés de résistance aux facteurs chimiques et physiques sont bien connues.

L'expérience acquise lors de l'extraction de l'endo-subtilysine nous a montré, au contraire, que celle-ci détruite en milieu acide se conserve en présence de ferments pancréatiques et en milieu légèrement basique; c'est donc elle qui agirait et non le corps microbien lui-même.

Ces résultats sont précieux car ils posent une indication thérapeutique ultérieure; l'endo-subtilysine serait absorbée et active par voie digestive.

Le bacille subtil ne se développant pas dans l'intestin, les deux hypothèses de départ sont donc mal fondées; on ne peut escompter ni son action substitutive, ni son pouvoir amylolytique.

L'observation (4) doit faire l'objet d'une discussion particulière.

Considéré comme fièvre d'origine centrale avec un élément septicémique probable, il a été retiré de l'hôpital par sa famille dans un état désespéré; le bacille subtil lui a été administré pendant quarante-huit heures à des doses considérables sans rapport avec les doses précédemment utilisées; de ce fait il nous est permis de déduire :

- 1) — l'innocuité absolue du bacille subtil en voie administré oralement;
- 2) — l'action du bacille subtil sur la diarrhée, prolongement toxi-infectieux d'une septicémie;
- 3) — l'indication du bacille subtil dans les septicémies.

2 — LES COLIBACILLOSES.

En présence des résultats encourageants obtenus dans le traitement des diarrhées, devant la fréquence des diarrhées précédant les crises de colibacillose urinaire et devant la mise en évidence du pouvoir lytique du *B. subtilis* sur le colibacille in vitro, nous nous sommes demandé quelle pouvait être l'action du bacille, administré per os et en instillations locales sur la colibacillurie elle-même.

Une rapide revue des travaux concernant la pathogénie des colibacilloses va nous permettre de poser le problème du mode d'action du bacille subtil.

HEITZ-BOYER a réuni sous un même vocable l'infection urinaire et les troubles intestinaux qui en sont très souvent l'origine : le syndrome entéro-rénal est un terme généralement adopté aujourd'hui qui permet, lorsqu'on se trouve en présence d'une infection des voies urinaires, de penser immédiatement

au facteur intestinal. Le germe en cause qui est le plus souvent un colibacille peut parfois être l'entérocoque.

La voie suivie par le germe infectieux pour parvenir aux voies urinaires a fait l'objet de plusieurs théories :

1) — L'infection ascendante, urétérale, ne paraît pas démontrée lorsque les méats urétéraux sont normaux.

2) — La voie descendante, hémotogène, prend par contre de jour en jour une plus grande place dans la pathogénie des pyélites à coli en particulier, depuis la démonstration qu'en fit ALBANAN dans sa thèse de 1883; l'infection sanguine peut elle-même s'alimenter à la source intestinale. NEUBNER a démontré que la constipation détermine le passage des colibacilles dans le sang et leur élimination par les urines; POSNER a vérifié le fait en ligaturant le rectum à des lapins; plusieurs heures après, l'urine de ces animaux était chargée de colibacilles.

Les colibacilles peuvent pénétrer dans la circulation générale par les veines ou par les lymphatiques de l'intestin; s'ils passent par les veines, ils empruntent la veine porte et traversent le foie avant de diffuser dans la circulation générale : H. BOYER a montré que le foie est un excellent milieu de culture pour le colibacille, ce qui explique la fréquence des infections hépatobiliaires d'origine intestinale (syndrome entéro-hépatique de DESGEORGES). Mais les pyélonéphrites sont rarement accompagnées d'une atteinte hépatique; il semble donc que les colibacilles peuvent passer dans le sang en évitant le foie; donc, en empruntant la voie lymphatique pour pénétrer dans la circulation générale et arriver aux reins qui les élimine en même temps que l'urine où ils peuvent pulluler. A. CAMBASSÉDÈS et J. BOURGEOIS, en injectant des cultures peu virulentes de coli dans les ganglions mésentériques du chat et du lapin ont créé des pyélites colibacillaires prouvant ainsi la réalité de l'étape lymphatique (1935). L'infection veineuse sans atteinte hépatique s'explique très bien pour les zones de pénétration tubulaires des veines hémorroïdales moyennes et inférieures.

3) — Il est possible d'autre part que l'infection emploie une voie uniquement lymphatique au niveau du colon droit par l'in-

termédiaire des lymphatiques du tissu rétro-péritonéal, des ganglions lombaires et de la capsule du rein.

4) — Enfin l'infection peut se faire par simple contiguité, par propagation d'une suppuration de voisinage.

Ces données récentes de l'étiologie des colibacilloses permettaient donc d'en envisager le traitement par le bacille subtil qui semblait bien agir sur les affections intestinales.

Les travaux récents de BOIVIN A. et CORRE L. apportent quelques précisions sur les conditions de pathogénicité du colibacille, sans toutefois nous en donner la clef.

« L'appareil urinaire (en règle générale) n'est infecté que par un seul type de colibacilles, qui persiste sans changements durant toute l'infection alors que la flore intestinale subit son renouvellement habituel... Un même type colibacillaire, caractérisé par sa constitution antigénique détaillée, paraît susceptible de jouer selon les cas, le rôle d'un saprophyte intestinal banal ou celui d'un agent d'infection des voies urinaires ».

Enfin une notion thérapeutique semble ressortir de ses travaux :

« L'extrême multiplicité des types antigéniques des colibacilles susceptibles d'infecter les voies urinaires montre qu'on ne peut guère attendre une action thérapeutique spécifique de l'utilisation des sérums et des vaccins anticolibacillaires ».

16) — Mme D..., trente-deux ans. L'affection débute le 11 décembre 1944, après quelques jours de petits troubles digestifs par une douleur vive dans la région lombaire droite et dans l'hypochondre droit, la température s'élève à 39°. On pense d'abord à une angio-cholécystite aiguë et on donne de l'urotropine, mais au bout de quatre jours, la température restant en plateau à 40°, la douleur se localise spontanément et à la palpation on porte le diagnostic de pyélonéphrite. Les urines sont purulentes et contiennent du colibacille. On essaie successivement le colitique Astier, le mandélium et la thiazomide, sans succès, car après une chute thermique momentanée, la température s'élève à 39°5 et 40°.

Nous voyons la malade pour la première fois à ce moment.

La région lombaire droite est très sensible à la palpation ainsi

que les points urétéraux du même côté. Le 12 janvier 1945 et les jours suivants, on donne par jour six comprimés contenant chacun 0,50 mg. de bacille subtil. A partir du 15 janvier, la température tombe et redevient normale le 17 janvier 1945. La malade cesse tout traitement le 22 janvier et est guérie. Revue en mai, on apprend qu'il n'y a pas eu de rechutes et que la guérison s'est maintenue.

- 17) — Mme R..., trente-et-un ans. Vue le 10 février 1945 parce qu'elle souffre depuis trois jours de dysurie. Les urines sont troubles à l'émission, l'examen cyto-bactériologique montre de nombreux bacilles type coli. On donne de l'ampho-vaccin, du néo-collargol et on pratique des instillations vésicales à l'argyrol à 5 %. Rapidement, les symptômes s'amendent et le 21 février 1945 la malade s'estime guérie et suspend son traitement.

Le 27 février, rechute. On lui donne du bacille subtil. Le 2 mars la malade ne souffre plus et on cesse le traitement le 5 mars. Revue le 15 mai, la malade n'a plus souffert depuis la fin du traitement.

- 18) — Mme A... est la femme d'un de nos collègues. Depuis trois mois elle souffre de troubles digestifs consistant en diarrhée et en nausées, survenant par crises de plusieurs jours suivies de cystite.

A chaque fois, la cystite est rapidement améliorée par des instillations d'argyrol; néanmoins, dans l'intervalle des crises, les selles restent défectueuses et les envies d'uriner impérieuses. Le premier mai survient une crise de cystite plus importante que les précédentes; on donne du bacille subtil, le 6 mai, les selles sont moulées, les symptômes urinaires complètement disparus et depuis, la santé est absolument normale.

- 19) — Mme P..., vingt-quatre ans. Vue le 17 avril parce que depuis deux ans elle a presque chaque mois une crise de cystite avec douleurs hématurie et pyurie. Dans l'intervalle des crises, elle souffre de la région rénale gauche. Les différents traitements utilisés : mandélicium, vaccins auto-coli, collargol, guérissent les poussées aiguës mais n'empêchent pas les récidives.

On la voit en période de calme; les urines sont claires mais contiennent du coli (culture d'urine prélevée par sondage). On ins-

titue alors un traitement par le bacille subtil pendant quinze jours à hautes doses de 5 mg. de corps microbiens.

Revue le 17 mai, elle n'a pas eu de crises depuis avril.

- 20) — Mme F..., quarante-quatre ans. Vue le 12 février 1945 pour une cystite aiguë avec hématurie, apparue à la suite d'une diarrhée abondante. Urines troubles contenant des hématies, des globules de pus et du coli-bacille en culture pure.

Traitée par le mandélium et du collargol « pekos », les phénomènes douloureux s'amendent rapidement. Le 22 février, rechute. On donne alors du bacille subtil. Dès le quatrième jour, la cystite est guérie; on continue le traitement pendant quinze jours. Depuis, la cystite n'est pas réapparue.

- 21) — Mme N..., trente-six ans. Vue le 12 décembre 1944 pour de fréquentes migraines, elle se plaint en outre d'avoir fréquemment des crises douloureuses de cystite qui cèdent rapidement après quelques jours d'urotropine pour réapparaître après deux à trois semaines de calme. On institue le traitement par le bacille subtil : 3 mg. par jour, huit jours par mois.

Revue le 31 mai pour la migraine, elle affirme n'avoir plus souffert de cystite depuis décembre 1944.

- 22) — Mme D..., trente-cinq ans. Vient pour une cystite rebelle, à urines claires, contenant du colibacille. Un premier traitement par ingestion de bacille subtil amène une rapide sédation des phénomènes dystoniques en février 1945. Une rechute survient en mai 1945, on pratique alors deux injections vésicales d'un voile émulsionné de bacille subtil à quarante-huit heures d'intervalle. Après la première injection, les urines donnent en culture quelques colonies de colibacille et une pousse abondante de bacille subtil. Six jours après la deuxième injection, les urines ne contiennent plus de coli; il pousse du bacille subtil; six jours plus tard, les urines sont stériles.

Depuis cette date, 14 mars, il n'y a plus eu de rechute.

- 23) — Mme R..., soixante-six ans. (Observation LEROY). Néo-prostatique suivie depuis le début de 1944.

Résection le 19 décembre 1945, sans incidents ni complications

immédiates. Le 24, la température s'élève à 39° et restera longtemps en plateau à ce chiffre ; aucune localisation infectieuse, même prostatique, n'est décelable. Intestin paresseux.

Examen des urines : coli pur très abondant, pas de pus. Thiazomide et antiseptiques sont sans action sur la température.

Après un nouvel examen urinaire montrant d'innombrables coli, on entreprend le traitement par le bacille subtil le 24 janvier. Instillation de culture liquide, 40 cc. pendant cinq jours et per os 5 mg. de bacilles pendant douze jours.

Dès le 25, l'odeur caractéristique des urines a presque complètement disparu. Un prélèvement fait le deuxième jour du traitement ne montre aucun coli, mais en revanche, les cocci (staphylo et entérocoque) se sont multipliés en abondance. L'action sur le coli paraît donc avoir été immédiate mais paraît avoir été purement inhibitrice vis-à-vis du coli ; elle n'a eu aucune influence sur la fièvre, sans doute en raison de la persistance des germes associés. L'hypothèse la plus favorable est cependant l'infection de la prostate après la résection ; des accidents circulatoires, certainement dus à des thrombus ou une embolie de l'artère humérale gauche. Des traitements variés sont restés inefficaces. Le 23 janvier, les urines avaient repris le même aspect et la même odeur qu'avant emploi du subtilis et contenaient du coli pur et un peu de pus.

En résumé, le subtilis semble avoir eu une action certaine mais passagère sur le colibacille et n'a pas pu avoir une action curative réelle chez ce malade, soit que les phénomènes fébriles fussent dus à d'autres germes, soit que l'action du subtilis ait été insuffisamment efficace ou insuffisamment prolongée.

- 24) — M. B..., treize ans. (Observation LEROY). Blessé par des éclats d'obus le 23 mai 1944, dont un au niveau du trou de conjugaison C₆ C₇, a provoqué des lésions de la racine du côté gauche. Paraplégie immédiate avec troubles de la sensibilité remontant au-dessus de l'ombilic, paralysie des sphincters anal et urétral. Sondage quotidien jusqu'au 26 mai, puis sonde à demeure. Prélèvement des urines le 31 mai : pus et coli. Les urines se troublent malgré l'administration de 5 grammes de thiazomide par jour, du 28 mai

au 3 juin. Intervention médullaire (Professeur PETIT-DUTAILLIS) le 5 juin. Pénicilline, septoplix ne modifient pas les urines.

La température restant élevée et cette fièvre étant attribuée à l'infection urinaire et intestinale par stase. Sérum Vincent et Thiazom : urines : *coli* (19 juin) et hémoculture négative. *B. subtilis* 3 mg. par jour, du 23 au 30 juin, avec trois instillations vésicales (5 cc.) les 24, 25, 26. Ce traitement ne modifie en rien l'aspect des urines, mais la courbe de température descend en lysis jusqu'au 1^{er} juillet, à cette date 37°2 le matin, et 37° le soir (voir la reproduction de la courbe de température).

Par la suite, les examens ayant montré la persistance du *coli*, les médications internes antiseptiques habituelles ont été reprises, associées aux lavements quotidiens sans résultat appréciable.

Le 28 août, nouveau traitement par subtilis seul (huit ou dix petits comprimés par jour), prolongé sans action sur les urines pendant douze jours.

Les urines sont redevenues parfaitement limpides lorsque les fonctions intestinales et vésicales ont été rétablies normalement au mois de novembre 1945.

25) — Mme P..., dix-huit ans. Grossesse de sept mois et demi. Est prise le 25 octobre 1945 de douleurs lombaires droites irradiées dans la cuisse droite avec frissons et clochers de température à 40°. Elle est vue le 2 novembre; elle présente alors des douleurs lombaires droites et des urines troubles d'odeur caractéristique et des accès de fièvre. Les urines prélevées le 3 novembre montrent de nombreux *coli* et leucocytes. Traitée par le bacille subtil à cette date (3 mg. par jour, petits lavages vésicaux de 50 cc.). Le 5 novembre, elle ne présente plus d'accès de fièvre. Présente encore le 8 novembre quelques leucocytes et *coli*. Les signes cliniques ont disparu; les urines sont encore un peu troubles.

26) — Mme J..., vingt-deux ans. Grossesse de sept mois et demi. Vue le 5 novembre 1945, elle présente des crises douloureuses lombaires surtout droites et des urines troubles. Le 7 novembre : urines : polynucléaires et *coli* très nombreux. Traitée à cette date par le bacille subtil (1 gramme de poudre par jour). Le 12, les dou-

leurs ont disparu et les urines se sont éclaircies. Elle continue le traitement pendant dix jours.

Le 16, elle accouche de deux jumelles : 2.190 grammes et 2.310 grammes. Un examen d'urines montre encore quelques coli, pas de polynucléaires.

- 27) — Mme S..., vingt ans. Grossesse de cinq mois et demi. Pyelonéphrite ayant commencé le 28 août 1945. Clochers de température à 40°, 40°2, urines très troubles. Examen des urines au 5 septembre : globules de pus abondants et très nombreux germes type coli : la malade est traitée pendant sept jours au bacille subtil à des doses croissantes de 4 à 5 mg. de bacille subtil par jour : le 12, aucune amélioration n'est notée, ni dans la courbe de température, ni dans l'aspect des urines. Il n'a pas été fait d'instillation vésicale.

Le 13 septembre, les accidents aigus cessent à la suite du traitement par les fontamides entrepris le 12 (10 gr. par jour). Le bacille subtil repris quelques jours plus tard est suivi de la réapparition de phénomènes fébriles qui cessent à nouveau sous l'action des thiazomides.

L'ingestion de bacille subtil administré uniquement par voie orale a échoué complètement, peut-être parce qu'il n'a pas été pratiqué d'instillations vésicales.

- 28) — Mme C... (Observation du Docteur CALLERIO).

Cystite. Souffre de phénomènes de dysurie depuis plusieurs mois : cystite chronique avec innombrables colibacilles — réfractaires à tout traitement. Après deux jours d'ingestion de 40 gr. de *B. subtilis* pesés humides : amélioration nette des symptômes : les urines sont claires et les cultures sur endo ne donnent que de très rares colonies.

- 29) — M. N..., quarante-cinq ans. Cystite à colibacilles ; la première crise date d'octobre 1940 et a duré un mois et demi. Depuis, et malgré un traitement aux thiazomides, a refait sept ou huit rechutes en quatre ans. Vu en avril 1945 : traité au bacille subtil : 3 à 5 mg. par jour pendant dix jours tous les mois. N'a plus présenté de rechutes.

- 30) -- Mme D..., trente-trois ans. Cystite à colibacilles avec phénomènes dysuriques. Traitée une première fois en janvier 1945 par injections vésicales et cultures au bouillon de bacille subtil : améliorée après trois, quatre injections. Revue en juin 1945 au moment d'une rechute. On ajoute au traitement précédent une administration per os de 3 à 5 mg. de bacille subtil pendant dix jours tous les mois. Guérison. N'a pas présenté de nouvelles crises.

DISCUSSION

1) — On constate donc une amélioration nette des cystites, sous l'effet d'une simple ingestion de *B. subtilis* par voie digestive, sous forme de culture lysée et d'instillations vésicales.

2) — Dans les cas graves de pyélonéphrite en particulier, la seule ingestion ne suffit pas toujours : il faut y adjoindre les lavages vésicaux qui semble avoir une action locale substitutive de grande importance pratique dans le traitement des colibacilluries.

CONCLUSIONS

- 1) — *Bacillus subtilis* possède des propriétés fermentatives importantes : une amylo-sucrase (β fructosidase), une protéase (qui liquéfie la gélatine et le sérum coagulé), une pénicillinase.

Il possède en outre un pouvoir bactériostatique, bactéricide et bactériolytique principalement à l'égard du streptocoque, du staphylocoque, du colibacille, du *B. typhique*, des anaérobies, et à l'égard du *B. tuberculeux* (souche ARLOING et COURMONT, bacille humain virulent).

- 2) — *Bacillus subtilis* administré per os sous forme de cultures séchées ou humides et à doses massives est parfaitement inoffensif pour l'homme et pour l'animal. Injecté à l'animal par voie intra-veineuse sous forme d'émulsion, il ne provoque de même aucune réaction nocive.

- 3) — Il est possible d'extraire à partir des voiles de *Bacillus subtilis* récoltés à la trente-cinquième heure de leur développement, une substance active, l'endo-subtilysine, que l'on peut extraire à l'état brut sous forme d'un liquide coloré en brun; une purification plus poussée a permis d'obtenir l'endo-subtilysine sous forme d'une poudre presque incolore qui en solution prend une coloration jaune très légère et qui est active sur le staphylocoque; on a pu séparer l'endo-subtilysine du colorant brun qui, lui, est inactif.

- 4) — L'activité de l'endo-subtilysine peut être dosée en utilisant son pouvoir inhibiteur à l'égard du staphylocoque (souche Londres) par la méthode des dilutions : dans ces conditions, l'extrait brut d'endo-subtilysine s'est montré actif à la dilution de 2×10^{-2} ; l'extrait purifié s'est révélé actif à 10^{-6} .
- 5) — Le sérum sanguin n'altère pas in vitro la puissance de l'endo-subtilysine. Celle-ci est parfaitement tolérée, chez l'animal et chez l'homme, en injections parentérales (intra-musculaire intra-veineuse et intra-rachidienne).
- 6) — In vivo, *Bacillus subtilis* a été administré dans les diarrhées aiguës et dans les diarrhées fonctionnelles, par analogie avec les ferments thérapeutiques.

a) — Nous rapportons douze cas de diarrhées de nourrissons et de diarrhées aiguës d'origine alimentaire, parmi lesquels onze ont été suivis dans les quarante-huit heures de la disparition des signes fonctionnels. Un cas (5) non amélioré par la dose ordinaire, a été suivi de guérison dans les quarante-huit heures après augmentation brutale de la dose.

b) — Nous avons, d'autre part, traité sept cas de diarrhées fonctionnelles, pris pour la plupart parmi des diarrhées fermentatives. Les résultats se répartissent ainsi :

Deux échecs, trois améliorations, deux guérisons.

Ce résultat peut s'expliquer, d'une part, parce que le bacille subtil ne prolifère pas dans l'intestin et ne peut y développer en quantité suffisante les ferments amylolytiques qu'il libère dans sa culture; il agit au contraire dans les diarrhées toxi-infectieuses aiguës

d'origine alimentaire, probablement par son pouvoir antibiotique.

- 7) — La fréquence des troubles intestinaux précédant les crises de colibacillose urinaire, l'action abiotique de *Bacillus subtilis* sur le colibacille et les résultats obtenus dans le traitement des diarrhées nous ont incité à traiter des cas de colibacilloses (quinze cas) ; les résultats se répartissent de la manière suivante :
Onze guérisons, trois améliorations et un échec. Notre hypothèse s'est donc vérifiée en pratique ; l'administration de *Bacillus subtilis* per os, associée à une instillation locale des voiles, permettent d'obtenir dans la plupart des cas une sédation des troubles fonctionnels, bien avant la disparition du colibacille des voies urinaires.
- 8) — Une observation, malheureusement isolée, nous permet de penser que l'amélioration obtenue peut être due, outre l'arrêt des troubles intestinaux, à une action effective sur une septicémie probable.
- 9) — Il ne nous a pas encore été possible d'utiliser en thérapeutique l'endo-subtilysine.

Vu, le Doyen :
BINET

Vu, le Président de Thèse :
LOEPER

Vu et Permis d'Imprimer
le Recteur de l'Académie de Paris :
G. ROUSSY

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — ALEXOPOULOS. — Studies in anti-biosis between bacteria and fungi. (*Ohio Jour. Sci.*, 1938, 38 (5) : 221).
- 2 — ARLOING (S.). — Sur l'obtention de cultures et d'émulsions homogènes du bacille de la tuberculose humaine en milieu liquide. (*C. R. Acad. Sc.*, 9 mai 1898, (1) : 1319).
- 3 — ANERSWALD (H.). — Welche Mikro organismen wirken auf Diphterie und Pseudo-diphterie bazillen antagonistisch. (*Obht. f. Bak.*, I, 1938, 142 : 32-41).
- 4 — ASHESHOW (I.-N.), STRELITZ (F.). — An antibiotic substance active against *Mycobacterium tuberculosis*. (*Science*, 2 fév. 1945, 101 : 119-120).
- 5 — BARRIEU (A.-R.). — Contribution à l'étude du rôle des associations microbiennes; les bacilles sporulés aérobies; leur action pathogène probable dans les plaies de guerre. (*Thèse*, Paris, 1919; *Presse Médicale*, 1919 : 28-40).
- 6 — BOWSER (B.-M.). — A study of the action of certain soil bacteria on *Mycobacterium tuberculosis*, varieties *Hominis* and *Bovis*. (*Thesis*, Univ. Pittsburgh, 1942).
- 7 — BELOZERSKI, PASSHINA. — Gramicidine S : constitution chimique. (*Le Médecin Français*, 1945, 5 : 5. *Am. Rev. Soviet Med.*, 1944, 2 : 138-140).
- 8 — BITTER, RAYMOND. — Bacterial antibiosis. (*Jour. Colorado, Wyoming Acad. Sc.*, 1941, 3 (1) : 16).
- 9 — BLAGOVESTCHENSKY. — Sur l'antagonisme entre les bacilles du charbon et ceux du pus bleu. (*Ann. de l'Inst. Past.*, 1890, 4 : 689).

- 10 — BOGENDORFER (L.). — Hemmungsstoffe aus Bakterien und ihren Kultursubstraten. (*Ztschr. f. d. ges. exper. Med.*, 1924, 41, 620).
- 11 — CHAIN (E.), FLOREY (H.-W.), JENNINGS (M.-A.), WILLIAMS (T.-I.). — Helvolic acid, an antibiotic produced by *Aspergillus fumigatus*. (*Brit. Journ. Exp. Path.*, 1943, 24 : 108).
- 12 — CHARRIN. — Action du B. pyocyaneux sur la bactériémie charbonneuse. (*C. R. Acad. Sc.*, avril 1888).
- 13 — CHASSIGNEUX. — *Bacillus subtilis* et virus rabique. (*Bull. Acad. Vétér. France*, 1945, 18 (10) : 295).
- 14 — CONN (H.-J.). — (*Journ. Infect. Dis.*, 1930, 46 : 341-50).
- 15 — DATH (S.). — Sur l'action bactériolytique d'un *Streptothrix*. (*C. R. Soc. Bio.*, 91 : 1442 — 92 : 461 et 1125 — 93 : 451 — 94 : 1267 — 97 : 1195).
- 16 — DUBOS (A.-S.). — (*Journ. Exp. Med.*, 1939, 70 : 1).
- 17 — DUBOS et CATANEO. — (*Journ. Exp. Med.*, 1939, 70 : 249).
- 18 — DUBOS (R.-J.). — The adaptative production of enzymes by bacteria (*Bact. Rev.*, 1940, 4 : 1-16).
- 19 — DUBOS (R.-J.), HOTCHKISS (R.-D.). — The production of bactericidal substances by aerobic sporulating bacilli. (*Jour. Exp. Med.*, 1941, 73, 629, 640).
- 20 — DUBOS (R.-J.). — Agents antimicrobiens d'origine biologique. (*J. Am. Med. Ass.*, 4 mars 1944, 124 : 633-637).
- 21 — DUCHON (L.). — Lyse et destruction des toxines bactériennes. (*Echos de la Médecine*, 15 octobre 1945).
- 22 — DUCLAUX (E.). — « Le Lait », Paris, Baillière, 1887 : 213.
- 23 — DUCLAUX (E.). — « Traité de Microbiologie ». Réaction sur le microbe des produits de sa vie cellulaire. Vol. I, Paris, Masson, 1898, pp. 236-249).
- 24 — FELDMAN, WILLIAM (H.), HINSHAW, CORWIN (H.). — Streptomycin in Experimental Tuberculosis. Streptothricin in Experimental Tuberculosis. (*The Am. review of Tuberculosis*, 1945, 52 : 269).
- 25 — FLEMING (A.). — On the antibacterial Action of cultures of a Peni-

- cellium with Special Reference to their use in the Isolation of B. Influenzae. (*Brit. Journ. Exp. Pathol.*, 1929, 10 : 226-236).
- 26 — FORD (W.-W.). — (*J. Bact.*, 1916, 1, 273-330).
- 27 — FORTINEAU. — Note sur le traitement du charbon par la pyocyanase. Antagonisme du charbon et du bacille pyocyanique. (*Ann. de l'Institut Past.*, 1910, 29, 955) .
- 28 — FRANCKE (H.), ISMET (A.) — Ueber Cytolyse. (*Abh. f. bakt.*, I., Or., 1926, 99 : 570-576).
- 29 — FREUDENREICH. — De l'antagonisme des bactéries et de l'immunité qu'il confère aux milieux de culture. (*Ann. Inst. Past.*, 1888, 2 : 200).
- 30 — GAUCHER, FAURE, GEORS. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1914, 77 : 229).
- 31 — GAUSE (G.-F.), BRAZHENIKOVA (M.-G.). — Gramicidine S : Origine et mode d'action. (*Médecin Français*, 1945, n° 5, p. 4). (*Am. Rev. Soviet. Med.*, 1944, 2 : 134-138. *Lancet*, 1944, 247, 715).
- 32 — GERBER (I.-E.), GROSS (M.). — Inhibition of growth of Mycobacterium tuberculosis by a mold product. The effect on Pathogenic Human Tubercle Bacilli. (*Science*, 1945, 101 : 616 et 1946, 103 : 167).
- 33 — GESSARD. — De la pyocyanine et de son microbe. (*Thèse Méd.*, 1882).
- 34 — GIBSON. — A study of B. subtilis. (*Jour. Dairy Res.*, 1944, 13, 3 : 248).
- 35 — GRATIA et COLL. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1924, 90 : 640; 91, 1442, 1925, 92 : 461).
- 36 — HETTICHE (H.-O.), WEBER (B.). — Die Ursache der bacteriziden Wirkung von Mesentericus filtraten. (*Arch. f. Hyg.*, 1939, 123 : 69-80).
- 37 — HOOGERHEIDE (J.-C.). — Antibiotic substances produced by soil bacteria. (*Bot. Rev.*, 1944, 10 : 599-638).
- 38 — HOTCHKISS (R.-D.), DUBOS (R.-J.). — The isolation of bactericidal substances from cultures of B. berris. (*J. Biol. Chem.*, 1941, 141 : 155-162).
- 39 — JANSSEN (E.-F.), HIRSCHMANN (D.-J.). — Subtilin - An antibacterial product of B. Subtilis. Culturing conditions and properties. (*Arch. Biochem.*, 1944, 4 : 297-309).
- 40 — JOHNSON (B.-A.), AUKER (H.), MELENEY (F.-L.). — Bacitracin : A

- new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. (*Science*, 1945, 102 : 376).
- 41 — KALLOS (P.). — Antibiotic action of an *Aspergillus* strain against *Mycob. tub.* (*Nature*, 1945, 155 : 300).
- 42 — KIMMELSTIEL (P.). — Weitere Versuche über die bakteriolytischen Fähigkeiten des *Bazillus* « *Mycoides Much* ». (*M. Kl.*, 1924, p. 419; *Absts Ohlt. f. Bakt. Ref.*, 1924, 77 : 372).
- 43 — KNAYSI (G.), GUNSALUS. — A study of the so. Called Marburg and the Lawrence and Ford strains of *B. subtilis*. (*Jour. Bact.*, 1944, 47 : 381).
- 44 — LAMANA (C.). — The status of *B. subtilis*, including a note on the separation of precipitinogens from bacterial spores. (*J. Bact.*, 1942, 44 : 611-617).
- 45 — LANFRANCHI (F.). — Increase in resistance toward *Pasteurella* and paratyphoid infection, in animals treated with *B. S.* and its polysaccharide. (*Bull. Soc. Ital. Biol. Sperim.*, 1942, 17 : 167).
- 47 — LEMOIGNE. — Le Groupe *Subtilis* et son rôle. (*Thèse Sc.*, 1913).
- 48 — LEVADITTI (C.), TWORT (J.-C.). — Sur la trypanotoxine du *B. subtilis*. Propriétés de la toxine. (*Bull. Soc. Biol.*, 1911, I : 645).
- 49 — LEVADITTI (C.), PENAU, PERAULT, ERISCHEN. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1943, 137 : 359).
- 50 — LEVADITTI (C.). — La Penicilline. Masson 1945. Paris.
- 51 — MAGARAO (M.-F.), ARRIAGADA (A.), THALES (S.). — Lytic action of *B. subtilis* ou *Mycobacterium tuberculosis*. (*Revista brasil. de Med.* juillet 1944, p. 556).
- 52 — MARIE (A.). — *Bacillus subtilis* et virus rabique. (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, 92 : 561).
- 53 — METCHNIKOFF (E.). — Recherches sur l'influence de l'organisme sur les toxines. (*Ann. Inst. Past.*, 1897, 11 : 801).
- 54 — METCHNIKOFF (E.). — The prolongation of life. (*New-York Putnam*, 1908).
- 55 — MUCH (H.), SARTORIUS (F.). — Über die nenartigen lysine des *Mycoides* « *Muche* ». (*Munch. Med. Klinik.*, 1924, 20 : 344-48).

- 56 — NICOLLE (M.). — Action du B. subtilis sur diverses bactéries. (*Ann. Inst. Past.*, 1907, 21 : 617).
- 57 — OLIVIER (H.-R.), DE SAINT-RAT (L.), BONET-MAURY (P.), BLANCHON (E.). — Etude de l'action biologique du bacillus subtilis. (*Acad. Méd.*, 5 Juin 1945).
- 58 — OLIVIER (H.-R.), BLANCHON (E.), DE SAINT RAT, BONNET MAURY (P.). — Pouvoir lytique du B. S. sur le colibacille et sur les bacilles typhiques et paratyphiques. (*Soc. Biol.*, 12 Mai 1945).
- 59 — OLIVIER (H.-R.), BLANCHON (E.), DE SAINT RAT (L.), BONNET MAURY (P.). — Utilisation du bacille subtilis dans le traitement des diarrhées. (*Soc. Gastro. Enterologie*, 11 Juin 1945).
- 60 — OLIVIER (H.-R.), BLANCHON (E.), DE SAINT RAT (L.), BONET MAURY (P.). — Traitement des colibacillooses par le B. subtilis. (*Soc. d'Urologie*).
- 61 — OLIVIER (H.-R.), DE SAINT RAT, BONET MAURY, BLANCHON. — Action du B. subtilis sur le bacille de Koch. (*C. R. Soc. Bio.*).
- 62 — OLIVIER (H.-R.). — Propriétés biologiques du bacille subtilis. (*Journal des Praticiens*, 30 Août 1945 et *Nature*. London 157, 238-9).
- 63 — OLIVIER (H.-R.), DE SAINT RAT (L.), CORVAZIER (P.). — Etude de l'activité d'un extrait de corps microbiens de bacille subtilis sur le staphylocoque. (*Soc. Biol.*, 24 Novembre 1945).
- 64 — OLIVIER (H.-R.), DE SAINT RAT (L.). — Action du bacille subtilis dans l'infection de la souris par le B. typhi-murium (*ibid.*).
- 65 — OLIVIER (H.-R.), DE SAINT RAT (L.). — Action du B. Subtilis et de le'ndo-subtilysine sur le bacille de Koch (souche Arloing et Courmont). (*Soc. tuberculose*. 12 Janvier 1946).
- 66 — OROUTT (F.-S.), BENGTSON (A.-W.). — Killing and desintegration of Mycob. tub. by a viridans streptococcis in vitro. (*Jour. Bact.*, 1945, 49 : 110).
- 67 — PASTEUR (L.), JOUBERT (J.). — Charbon et Septicémie. (*C. R. Acad. Sc.*, 1877, 85 : 101-105; *Bull. Ac. Méd.*, 1877, 6 : 781).
- 68 — POSTERNAK (T.), RUELIUS (U.-W.). — Sur une synthèse de la fumigatine. (*Helv. Chim. Acta.*, 1943, 26 : 2045-2049).
- 69 — PRINGSHEIM (E.-G.). — (*Chlt. f. Bakt. Paras.*, 2, 1920, 51 : 72).

- 70 — RAKISTEN (M.-L.) et NOFF (T.-L.) S. — Inhibition on stap. Bacteriophage and the virus of vesicular stomatis. (*J. Bact.*, 1936, 31 : 55).
- 71 — RAMON (G.), RICHOU, RAMON (J.). — De l'antagonisme microbien en général et en particulier des propriétés bactériostatiques, bactéricides et bactériolytiques des filtrats de culture du *B. subtilis*. (*C. R. Acad. Méd.*, 8 Mai 1945).
- 72 — RAMON (G.) et RICHOU (R.). — Des propriétés antagonistes des filtrats de culture du *B. subtilis* à l'égard de certaines bactéries et des toxines microbiennes. (*Presse Méd.*, 28 Juillet 1945).
- 73 — RAMON (G.) et COLLA — (*C. R. Acad. Sc.*, 12 Mars 1945 — 6 Août 1945 — 10 Octobre 1945 — 28 Janvier 1946).
- 74 — RICH (A.-R.), FOLLIS (R.-H.). — The inhibitory effect of sulfonilamide on the developpement of experimental tuberculosis in the guinea pig. (*Bull. J. Hopkins Hosp.*, 1938, 62, 77).
- 75 — ROSENTHAL (L.). — Les lyso bactéries. (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, 9 2 : 78. et 472; 93, 1569, 1926, 94 : 309 et 1059 : 95 : 10).
- 76 — ROSENTHAL (L.). — (*Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1941, 46 : 448).
- 77 — ROUX (J.-C.), GOIFFON. — (*Presse Méd.*, 10 Janvier 1935).
- 78 — SAINT RAT (L. de), OLIVIER (H.-R.). — Extraction et purification de l'endo-subtilysine. (*C. R. Ac. Sc.*, 28 Janvier 1946).
- 79 — SALLE (A.-J.), JANN (G.-J.). — Subtilin. An antibiotic produced by *B. subtilis*. I. Action on various organisms. (*Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1945, Octobre, 60 : 60-64).
- 80 — SANFELICE (F.). — Der antagonismus des Milzbrand bacillus gegenüber dem « *B. coli* ». (*Arch. f. Hyg.*, 1933, 110 : 348-54).
- 81 — SCHATZ (A.), WAKSMANN (S.-A.). — Effect of Streptomycin and other antibiotic substances in *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1944, 57 : 244-248).
- 82 — SCHATZ (A.), ALBERT, BUGIE, WASKMANN. — Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram pos. and Gram nég. bacteria. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1944, 55 : 66).
- 83 — SCHILLER (I.). — « Sur les produits des microbes en association ». (*Cult. f. Bakt. Paras. I. Or.*, 1914, 73 : 123-127).

- 84 — SCHILLE (I.). — Über « erzwungene » antagonisten. *Levure B. tuber.* IV. (*Chlt. f. Bakt. Or.*, 1925, 96-54).
- 85 — SCHILLER (I.). — Über « erzwungene » antogonisten. (*Chlt. f. Bakt. Or.*, 1924, 91 : 68; 92 : 124; 1925, 94 : 64; 96 : 54).
- 86 — SCHOENTAL (R.). — The nature of the antibacterial agents present in *pseudomonas pyocyanea* cultures. (*Brit. J. exp. Path.*, 1941, 22 : 137-47).
- 87 — SCHUBERT (J.). — (*Chlt. Bakt.*, 1928, 108 : 151).
- 88 — SIRO TININ (V.-N.). — Ueber die entwicklungshemmenden Stoffwechsel producte der Bacterien und die sog. Retentions hypothese (*Ztschr. f. Hyg. u. Infekt.*, 1882, 4 : 262).
- 89 — SMITH (M.-I.), EMORT (E.-W.). — (*Public Health Repts*, 1944, 59 : 417).
- 90 — SOLT HYS (M.-A.). — Antibiotic action of *Aspergillus fumigatus* against *Mycobacterium tuberculosis*. (*Nature.*, 1944, 154 : 550).
- 91 — SOULE (H.). — *Bacillus subtilis*. — Son identité. 1932.
- 92 — STORES (J.-L.), WOODWARD (C.-T.). — (*J. Bact.*, 1941, 41 : 33).
- 93 — STREPTOMYCIN (anonyme). — (*Amer. Prof. Pharmacist.*, 1945, 11 : 242-245).
- 94 — VALLÉE (M.). — Etude du pouvoir bactériolytique du *B. subtilis*. Lysine et Analysine. (*Soc. Biol.*, 10 Février 1945 et 7 Juillet 1945. *Rec. méd. Vet. Ec. Alfort* 1945, 121 : 273).
- 95 — VAN CANNEYT. — Action du *B. subtilis* et de ses sécrétions le *B. K.* (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, 95 : 878).
- 96 — VAUDREMER (A.). — Action de l'extrait filtré de l'*Aspergillus fumigatus* sur les Bacilles tuberculeux. (*C. R. Soc. Biol.*, 1912, 73 : 501, 1913, 74 : 278 et 752; *Bull. Acad. Méd.*, 1927, 97 : 202; 1930, 103 : 622).
- 97 — WAKSMANN (S.-A.), VOODRUFF (H.-B.). — Sur la présence dans le sol de substances bactériostatiques et bactéricides (*Soil. Sci.*, 1942, 53 : 233-239).
- 98 — WAKSMANN (S.-A.), SCHATZ (A.). — Strain specificity and production of antibiotic substances. (*Proc. Nat. Acad. Sciences U .S. A.*, 1943, 29 : 74).

- 99 — WAKSMANN (S.-A.). — Microbial Antagonisms and Antibiotic substances. (*New-York* : Commonwealth Fund, 1945).
- 100 — WEILAND (P.). — (*Cblt. Bakt. I. Abst. orig.*, 1936, 136 : 451).
- 101 — WEILAND (P.). — (*Cblt. Bakt. I. Abst. orig.*, 1941, 147 : 321-334).
- 102 — WELSCH (M.). — Propriétés bactériolytiques du Streptothrix et sporulation. (*C. R. Soc. Biol.*, 1936, 123 : 1013; 1937, 124 : 1240; 125 : 1053; 126 : 244 et 1254; 1938, 27 : 347; 128 : 795 et 1170; 1939, 130 : 104 et 797; 131 : 1296).
- 103 — WILKINS (W.), HARRIS. — Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi I. Préliminary examination of 190 fungal species. (*Brit. J. exp. Path.*, 1942, 23 : 166-169).
- 104 — WOLF (J.-E.). — (*Cblt. Bakt. I.*, 1920, 84 : 241).

SUPPLEMENT A LA BIBLIOGRAPHIE

- BUGGS et BRONSTEIN. — The presence in normal serum of inhibiting substances against *B. subtilis*. (*Science*, 1946, 103, Mars, 363-4).
- FOSTER et WOODRUFF. — Antibacillin, a naturally occurring inhibitor of a bacillin. (*J. Bact. Bact.*, 1946, 51, Mars, 371-380).
- SALLE (A.-J.) et JANN (G.-J.). — The effect of subtilin in the treatment of experimental infections in animals. (*J. Bact. Bact.*, 1946, 51, Mai, 592).
- SALLE (A.-J.) et JANN (G.-J.). — Toxicity of subtilin to living embryonic tissue (*Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1946, 61, 23-4).
- SALLE et JANN. — Subtilin, antibiotic produced by *B. sub.*; effect on type III pneumococcus in mice. (*Proc Soc. Exp. Biol. N. Y.*, 1946, 62, Mai, 40-42).
- VALLÉE (M.) et SANDINOS (S.). — Titrage de la subtilisine. Relation entre son pouvoir amylolytique. (*C. R. Soc. Biol.*, Nov. 1946, 140).

